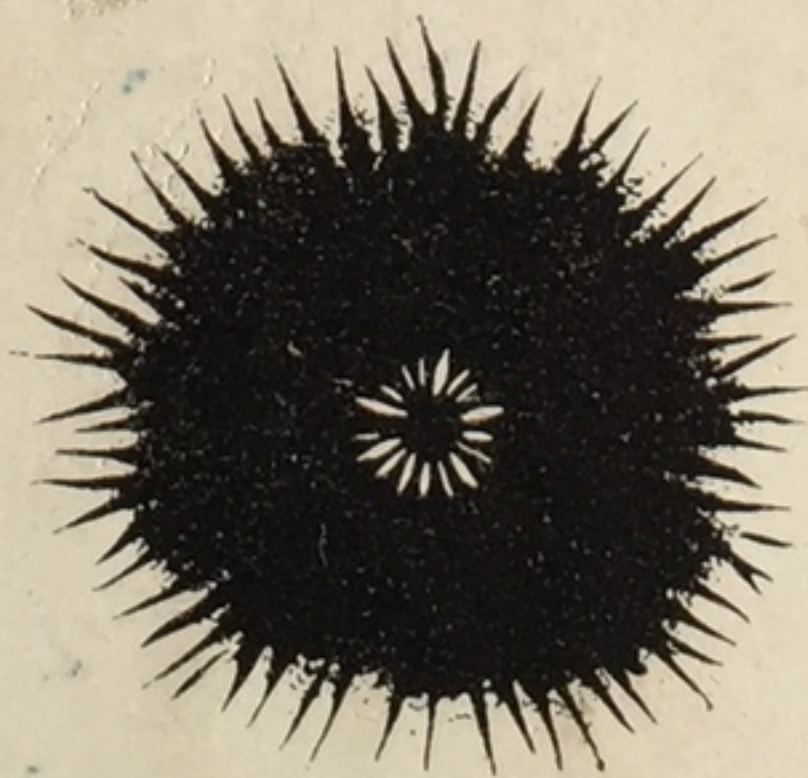


М · Е · БЕКЕР

# ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ





Микробиологическая промышленность обеспечивает народное хозяйство такими необходимыми продуктами, как кормовые дрожжи, аминокислоты, ферменты, антибиотики, витамины, биологические средства защиты растений, бактериальные удобрения и др. Достижения науки и технический прогресс позволяют постоянно совершенствовать технологические схемы, появляется новое оборудование, порой коренным образом меняется сырьевая база. В настоящее время благодаря успехам микробиологической науки в нашей стране вступили в строй и дают ценнейшую продукцию для сельского хозяйства гиганты биоиндустрии — крупные заводы по производству белково-витаминных концентратов (БВК) на основе парафинов нефти.

Автор дает в книге описание не только применяемых на производстве процессов, но и знакомит читателей с разработанными в лабораторных условиях процессами микробиологического синтеза. Так, наряду с технологией производства дрожжей на основе углеводов и парафинов показана возможность получения богатой белком биомассы на основе целлюлозного сырья без химического гидролиза при помощи грибов, а также на основе природного газа и этанола. Описаны принципы получения  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты из жидких парафинов, триптофана — из антраниловой кислоты, лизина — по непрерывному методу ферментации, целлюлазы — на среде с молочной сывороткой и др. Кратко показаны принципы и возможности иммобилизации ферментов и целых клеток микроорганизмов. Впервые в литературе по микробиологической технологии приводятся данные о переработке навоза при животноводческих комплексах.

Ряд новых материалов, приведенных автором в книге, выгодно отличает ее от латышского издания.

Автор книги — М. Е. Бекер — член-корр. АН Латв. ССР, один из ведущих специалистов в области микробиологического синтеза.



**М • Е • БЕКЕР**

**ВВЕДЕНИЕ  
В БИОТЕХНОЛОГИЮ**











М·Е·БЕК



М · Е · БЕКЕР

# ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ

*Авторизованный перевод с латыш-  
ского И. А. ГРАФФ*

МОСКВА  
«ПИЩЕВАЯ ПРОМЫШЛЕННОСТЬ»  
1978



БЕКЕР М. Е. ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ. Пер. с латышского (Рига, 1974), 1978.

В книге изложены основы микробиологического получения белковых и хлебопекарных дрожжей, бактериальных удобрений, вакцин, липидов, полисахаридов, спиртов, органических кислот, аминокислот, витаминов, антибиотиков, ферментов. Показаны принципы микробиологической трансформации органических соединений и сущность очистки сточных вод. Эти вопросы рассмотрены в технологическом аспекте с краткой характеристикой биохимии и микробиологии каждого процесса.

В книге впервые систематизированы сведения по получению аминокислот, витаминов, липидов, микробных полисахаридов, по трансформации органических веществ. Для их производства служат отходы пищевой промышленности, которые не всегда рационально используются.

Б  $\frac{31709-048}{044(01)-78}$  48-78

© Издательство «Звайгэне», 1974 г.

© Перевод на русский язык. Издательство «Пищевая промышленность», 1978 г.



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие . . . . .	3
Глава I. Микроорганизмы . . . . .	7
Значение микроорганизмов в природе . . . . .	10
Величина и форма клеток . . . . .	13
Структура клетки . . . . .	21
Химический состав клеток . . . . .	23
Роль воды в процессах жизнедеятельности . . . . .	27
Глава II. Обмен веществ и ферментативные процессы . . . . .	27
Ферменты и коферменты . . . . .	32
Кинетика ферментативных реакций . . . . .	36
Важнейшие энергетические процессы . . . . .	40
Биосинтез белков и нуклеиновых кислот . . . . .	46
Принципы регуляции метаболизма . . . . .	52
Глава III. Культивирование микроорганизмов . . . . .	52
Оптимальные условия культивирования . . . . .	61
Рост и размножение . . . . .	67
Методы культивирования . . . . .	75
Глава IV. Основы микробиологического производства . . . . .	75
Сырье . . . . .	86
Технологическое оборудование . . . . .	95
Этапы технологического процесса . . . . .	103
Глава V. Получение микробной биомассы . . . . .	103
Хлебопекарные дрожжи . . . . .	104
Получение дрожжей из мелассы . . . . .	106
Выращивание дрожжей на этанольной среде . . . . .	109
Автолизат дрожжей . . . . .	111
Кормовые дрожжи . . . . .	117
Кормовая биомасса из целлюлозосодержащих субстратов . . . . .	120
Микробная биомасса из природного газа . . . . .	121
Биомасса водородных бактерий . . . . .	122
Медицинские дрожжи . . . . .	122
Закваски молочнокислых бактерий . . . . .	124
Вакцины . . . . .	127
Бактериальные удобрения . . . . .	131
Бактериальные средства защиты растений . . . . .	133
Глава VI. Получение липидов, полисахаридов, этилового спирта и органических растворителей . . . . .	133
Липиды . . . . .	135
Полисахариды . . . . .	135
Зимозан . . . . .	136
Декстран . . . . .	138
Этиловый спирт . . . . .	142
Органические растворители . . . . .	



Глава VII. Получение органических кислот . . . . .	143
Уксусная кислота и уксус . . . . .	143
Молочная кислота . . . . .	145
Пропионовая кислота . . . . .	146
Лимонная кислота . . . . .	147
Глюконовая кислота . . . . .	152
Фумаровая кислота . . . . .	152
Итаконовая кислота . . . . .	153
Циклические кислоты . . . . .	153
Кетокислоты . . . . .	154
Глава VIII. Получение аминокислот . . . . .	155
Методы получения аминокислот . . . . .	155
Лизин . . . . .	159
Триптофан . . . . .	166
Глутаминовая кислота и глутамат натрия . . . . .	168
Глава IX. Получение витаминов, антибиотиков и ферментных пре- паратов . . . . .	171
Получение витаминов . . . . .	171
Витамины группы В . . . . .	171
Эргокальциферол (D <sub>2</sub> ) . . . . .	180
Каротиноиды . . . . .	182
Получение антибиотиков . . . . .	184
Пенициллин . . . . .	186
Кормовой биомидин (хлортетрациклин) . . . . .	190
Получение ферментных препаратов . . . . .	193
Технические препараты ферментов . . . . .	194
Выделение и очистка ферментов . . . . .	202
Иммобилизация ферментов и целых клеток микроорга- низмов . . . . .	204
Глава X. Микробиологическая трансформация органических соеди- нений . . . . .	208
Принципы трансформации . . . . .	208
Трансформация D-сорбита в L-сорбозу . . . . .	210
Трансформация стероидов . . . . .	212
Трансформация пенициллинов . . . . .	214
Глава XI. Использование микроорганизмов для защиты окружающей среды . . . . .	215
Очистка сточных вод . . . . .	215
Микробиологическая переработка навоза . . . . .	223
Список использованной литературы . . . . .	226
Предметный указатель . . . . .	228



## ПРЕДИСЛОВИЕ

---

Микробиологические процессы широко используются в различных отраслях народного хозяйства. Успехи биологических и инженерных наук позволяют создать высокопроизводительные, основанные на промышленных методах управляемые процессы микробиологического производства ряда пищевых и кормовых продуктов, медикаментов, органических веществ.

Достижения биотехнологии позволяют ускоренными темпами развивать микробиологическую промышленность, в частности производство кормового белка, аминокислот, ферментов, витаминов, антибиотиков, средств биологической защиты растений, бактериальных удобрений и др.

Можно предвидеть возможность широкого использования микробиологических процессов в сфере сельского хозяйства, особенно при создании аграрно-промышленных комплексов. Уже имеются межколхозные дрожжевые заводы, обсуждаются проекты создания биоцехов при кормозаготовительных пунктах для рационального использования местного сырья и превращения малоценных отходов сельскохозяйственного производства в богатые белками и незаменимыми аминокислотами кормовые продукты.

Биотехнология тесно связана с технической микробиологией и биохимией. В биотехнологии применяются многие методы химической технологии, особенно на конечных этапах производственного процесса, при выделении веществ из культуральной жидкости или из биомассы микроорганизмов.

Чтобы получить какое-либо вещество микробиологическим путем, необходима соответствующая культура микроорганизмов. Надо знать физиологию этой культуры, т. е. комплекс процессов, протекающих в клетке, и условия, определяющие их протекание в желательном направлении. Следует отметить, что в промышленности биологические процессы осуществляются не только с помощью микроорганизмов, но и при помощи клеток или тканевых культур растений и животных, а также при использовании изолированных ферментов.

Провести микробиологический синтез на практике означает культивировать избранную культуру микроорганизмов в питательной среде определенного состава, строго соблюдать техноло-



гию, а также ограничить или полностью исключить нежелательную микрофлору. Во время культивирования клетки растут и размножаются. В результате активности находящихся в клетке ферментов не только увеличивается биомасса клеток, но иногда и синтезируются различные, часто очень полезные внеклеточные вещества, которые можно выделить из среды культивации.

В состав клеток микроорганизмов, так же как и в состав других живых клеток, входят белки, ферменты, аминокислоты, витамины, липиды и другие органические вещества, которые можно выделить из биомассы клеток, применяя методы химической технологии. Эту же биомассу можно использовать как источник получения перечисленных выше веществ для питания человека (дрожжи) и для целей животноводства. При оптимальных условиях в среде культивирования можно достичь выхода до 100 г/л сухой биомассы.

Микробиологическим процессам, протекающим в живых клетках, присущи огромные потенциальные возможности. Так, бактерии за сутки могут переработать объем веществ, в 30—40 раз превышающий массу самих клеток.

Клетки микроорганизмов растут и делятся очень быстро. Некоторые бактерии дают новую генерацию каждые 30 мин. Это значит, что за 5 ч из одной клетки может образоваться примерно 1000 клеток. Масса одной бактерии равна  $0,2 \cdot 10^{-9}$  мг, но масса образованной из нее биомассы через 16 ч равна уже 1 мг. В течение суток одна клетка образует около 1 кг биомассы, а в течение 2 сут — такое количество биомассы, которое трудно было бы вместить в один железнодорожный состав. Однако на практике прирост биомассы значительно меньше и новое поколение клеток, например дрожжевых, образуется через каждые 2—3 ч. При выращивании кормовых дрожжей в 1 м<sup>3</sup> питательной среды за 1 ч можно получить около 3 кг биомассы дрожжевых клеток в пересчете на сухое вещество. Это означает, что с каждого кубического метра аппаратуры в течение суток можно получить около 30 кг белков. Для получения такого количества животных белков в сутки необходимо держать 100 коров, а для получения такого же количества растительного белка, используя, например, горох, требовалось бы 18 га посевов этой культуры. Таким образом, микроорганизмы в сотни тысяч раз продуктивнее животных и растений.

Для микробиологического получения аминокислот используют способность различных культур ауксотрофных мутантов синтезировать определенную аминокислоту, например глутаминовую или лизин. Количество аминокислот, производимых клеткой, в 10—100 раз превышает их расход на построение самих клеток. Эти аминокислоты выделяются в окружающую среду. В течение



двух дней в 1 л питательной среды накапливается аминокислот 30—60 г и более.

По сравнению с химическими микробиологические процессы имеют ряд преимуществ. Под действием биологических катализаторов — ферментов реакции протекают при сравнительно низкой температуре (20—60°C), нет необходимости и в повышении давления. Благодаря этому значительно упрощается технологический процесс, а также уменьшаются размеры капиталовложений и эксплуатационные расходы.

Надо отметить, что для культивирования микроорганизмов обычно используют дешевое и недефицитное сырье, например побочные продукты промышленности и сточные воды. Кормовые дрожжи можно получить из отходов спиртовой промышленности, мелассной барды, гидролизатов древесины, парафина и др.

В приведенных примерах из сравнительно простых веществ — субстратов питательной среды — с помощью микроорганизмов синтезируются сложные органические вещества. Последнее время при помощи микроорганизмов практикуют различные превращения молекул органических веществ — микробиологическую трансформацию. Отбирая особые культуры микроорганизмов (в специальных каталогах ферментативных реакций культур микроорганизмов указано, какие биохимические реакции осуществляет данная культура) можно провести самые различные химические реакции — окисление и восстановление, фосфорилирование, аминирование, специфический гидролиз и другие реакции, провести которые химическим путем очень трудно, а иногда и невозможно. В качестве примера можно привести превращение D-сорбита в L-сорбозу. Микробиологическая трансформация открыла большие возможности получения препаратов стероидов. Этот метод широко используется для промышленного получения кортизона, гидрокортизона, преднизолона и др. С помощью микробиологической трансформации можно превращать продукты химического синтеза в другие необходимые для народного хозяйства вещества. В последнее время интенсивно развивается новое направление в биотехнологии — иммобилизация на специальных носителях ферментов или клеток для продления срока их использования.

В нашей стране микробиологическому синтезу уделяется большое внимание. Предприятия микробиологической промышленности производят кормовые белки, ферменты, витамины, аминокислоты и антибиотики, а также различные препараты для сельского хозяйства — нитрагин, азотобактерин, энтобактерин и ацидофильные культуры. Медицинская промышленность также получает ряд препаратов микробиологическим путем (антибиотики, гормоны, токсины).



В пищевой промышленности микроорганизмы используются при получении ряда продуктов. Так, алкогольные напитки — вина, шампанское, пиво, коньяки, ликеро-водочные изделия, виски и другие продукты брожения получают при помощи дрожжей. Хлебопекарная промышленность связана с использованием дрожжей и бактериальных заквасок. Немаловажную роль в народном хозяйстве играют также органические кислоты, такие как лимонная, уксусная, молочная, итаконовая и другие, получаемые микробиологическим путем. Молочная промышленность производит продукты молочнокислого брожения — сметану, кефир, простоквашу, сыры.

При издании книги «Введение в биотехнологию» на русском языке текст несколько переработан и дополнен новейшими данными. Дана характеристика новых видов сырья, применяемого для приготовления питательных сред для культивирования микроорганизмов. Показана возможность производства богатой белком микробной биомассы не только на средах, содержащих растворимые углеводы, но и на средах, содержащих углеводороды нефти, природного газа, этанол, целлюлозу сельскохозяйственных отходов и др. Расширен раздел о получении ферментных препаратов, в частности показаны принципы иммобилизации ферментов и клеток микроорганизмов, приведены новые данные по микробиологической трансформации органических соединений. Раздел об использовании микробиологических процессов для защиты окружающей среды дополнен последними работами в области утилизации навоза.

В предлагаемой вниманию читателей книге использован в ряде случаев опыт микробиологических заводов Латвии и работы Института микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР.

от которого за  
тез. Он осущес  
мент хлорофил.  
бактерии) явля  
Однако некотор  
хлореллы, содер  
фотосинтез. Сум  
так:

$6\text{CO}_2$

В процессе фо  
другие вещества  
плазму. Баланс ф  
дующим уравнени

5447000 к

+ минеральные  
вещества

Указанное коли  
мов углерода, 108  
слорода, 16 грамм  
минеральных веще

С помощью веще  
процессе фотосинте  
газа, как полагают  
Водород, который  
ет очень большое э  
превращение особе  
дифосфата (АДФ)  
трифосфат

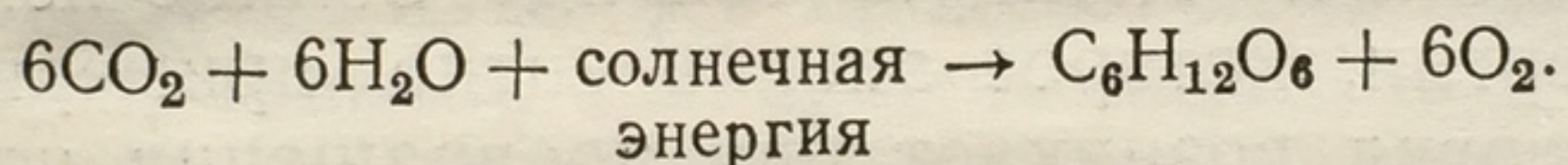


## Глава I

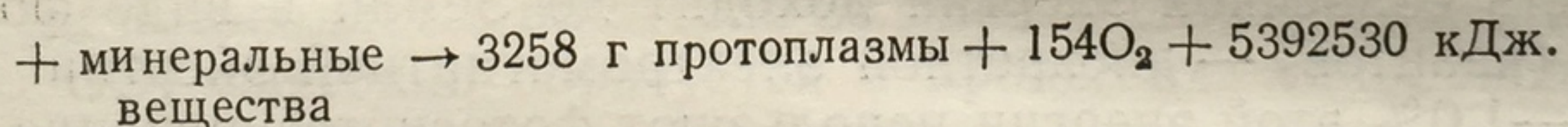
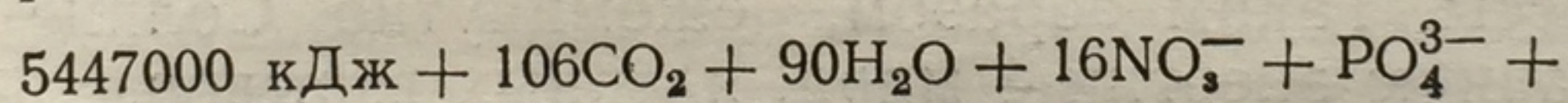
# МИКРООРГАНИЗМЫ

## ЗНАЧЕНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ В ПРИРОДЕ

Самым важным процессом в живой природе, от которого зависит существование человека, является фотосинтез. Он осуществляется растениями, содержащими зеленый пигмент хлорофилл. Микроорганизмы (дрожжи, плесневые грибы и бактерии) являются бесхлорофильными низшими растениями. Однако некоторые низшие одноклеточные растения, например хлореллы, содержат хлорофилл и, следовательно, осуществляют фотосинтез. Суммарную реакцию фотосинтеза можно записать так:



В процессе фотосинтеза получается не только глюкоза, но и другие вещества очень сложного состава, образующие протоплазму. Баланс фотосинтеза протоплазмы можно выразить следующим уравнением:

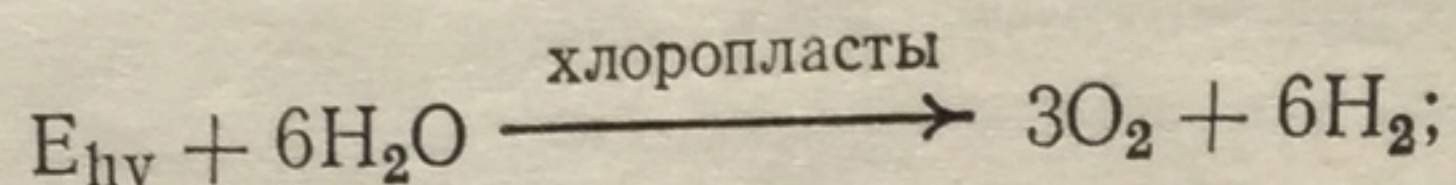


Указанное количество протоплазмы содержит 106 грамм-атомов углерода, 108 грамм-атомов водорода, 48 грамм-атомов кислорода, 16 грамм-атомов азота, 1 грамм-атом фосфора, 815 г минеральных веществ.

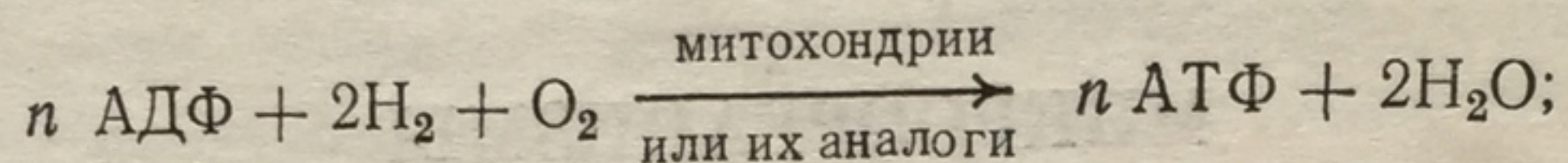
С помощью меченых атомов доказано, что освобожденный в процессе фотосинтеза кислород образуется не из углекислого газа, как полагали раньше, а из воды, в результате фотолиза. Водород, который одновременно образуется при фотолизе, имеет очень большое энергетическое значение, так как стимулирует превращение особого энергопереносящего вещества — аденозиндифосфата (АДФ) в энергетически более богатое соединение — аденозинтрифосфат (АТФ). В упрощенном виде энергетические процессы фотосинтеза можно изобразить следующим образом:



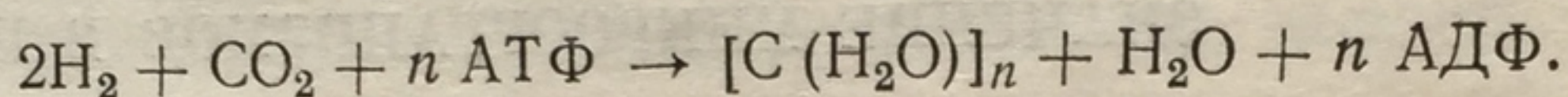
1) фотолиз воды



2) переход АДФ в АТФ



3) синтез биомассы



Как видно из этих реакций, фотосинтез происходит при участии клеточных органоидов — хлоропластов, где находится хлорофилл, и митохондрий.

Обратный фотосинтезу процесс, который связан с окислением органических веществ, также происходит в митохондриях. При окислении глюкозы образуется углекислый газ, вода и высвобождается энергия.

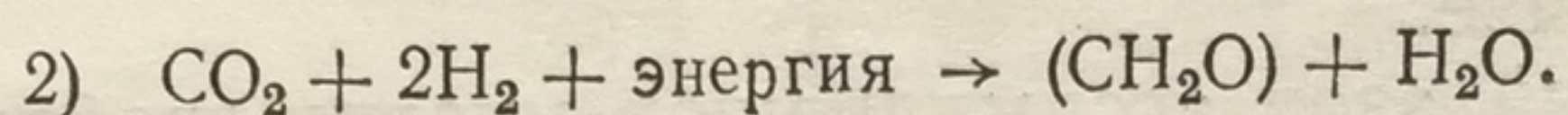
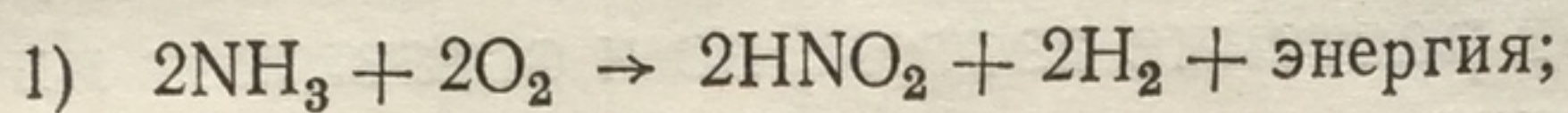
Первичным источником энергии для биологических процессов является Солнце. Каждую секунду Солнце излучает такое количество энергии, которое эквивалентно примерно 4 млн. т массы. Эта энергия возникает при превращении ядер водородных атомов — протонов в ядра гелия в ходе ядерных реакций, протекающих на Солнце. Чтобы представить количество излучаемой Солнцем энергии, необходимо помнить, что при самом мощном термоядерном взрыве в энергию превращается примерно 1 кг массы. Таким образом, ежеминутно Солнце излучает энергию, равную энергии 4 млрд. ядерных взрывов.

Часть солнечной энергии доходит до Земли в виде фотонов света (квантов) — дискретной электромагнитной энергии. Только 0,1—1,0% этой энергии используют фотосинтезирующие организмы. В течение года даже из этого количества усвоенной энергии в процессе фотосинтеза образуется 164 млрд. т органической массы. Аккумулированная в органических веществах энергия широко используется в микробиологическом биосинтезе. В него, естественно, включаются и другие виды энергии, которые используют предприятия микробиологической промышленности (электричество, топливо). Человек употребляет в пищу главным образом органическую массу, полученную в сельскохозяйственном производстве, которая составляет 5% всей продукции фотосинтеза. Огромные богатства органических веществ содержат леса. Их продукция рассматривается как перспективное сырье для микробиологической промышленности.

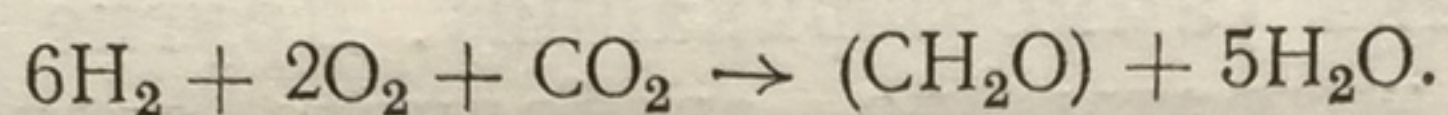
В природе встречаются хемосинтезирующие микроорганизмы, которые способны синтезировать органические соединения



из  $\text{CO}_2$  без помощи хлорофилла и без прямого использования солнечной энергии. Энергию, необходимую для синтеза, они получают, окисляя минеральные вещества. К хемосинтезирующим микроорганизмам относятся нитрифицирующие бактерии, которые, окисляя аммиак до азотистой кислоты, высвобождают необходимую для синтеза энергию:



К хемосинтетикам относятся и водородные бактерии, получающие энергию в процессе окисления молекулярного водорода:



Водородные бактерии, культивируемые в питательной среде, которая содержит минеральные вещества и смесь газов  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$  и  $\text{CO}_2$ , дают богатую белками микробную массу. Так как  $\text{H}_2$  и  $\text{O}_2$  можно получить электролизом из воды, то пригодную для целей питания и животноводства органическую массу можно получать из минеральных веществ, воды, воздуха и электроэнергии.

Микроорганизмы, которые способны сами синтезировать органические вещества из  $\text{CO}_2$  в процессе хемо- или фотосинтеза, называют автотрофными, а микроорганизмы, для существования которых необходимы уже готовые органические вещества, — гетеротрофными. В круговороте углерода в природе принимают участие как авто-, так и гетеротрофные организмы, причем существует определенное равновесие между фиксирующими  $\text{CO}_2$  фотосинтезирующими организмами (главным образом растениями) и микроорганизмами, разрушающими органические соединения. Установлено, что ежегодно в процессе фотосинтеза из атмосферы потребляется примерно 60 млрд. т  $\text{CO}_2$  и такое же количество  $\text{CO}_2$  ежегодно образуется в процессах микробиологической минерализации.

Микроорганизмы разрушают крахмал и даже такое стабильное вещество, как целлюлоза растений, до сахаров, спиртов, кислот, метана, диоксида углерода и водорода. Таким образом, микроорганизмы участвуют в общем круговороте углерода (см. приложение 1 цветное).

Растения, использующие минеральные соединения фосфора, образуют необходимые нуклеиновые кислоты. Микроорганизмы разрушают содержащиеся в остатках растений фосфорорганические вещества и в виде минеральных соединений опять возвращают в почву. Таким образом, микроорганизмы активно участвуют в процессе превращения фосфора (см. приложение 2 цветное).

Важное значение имеют микроорганизмы в процессе превращения азота (см. приложение 3 цветное).



Атмосферный азот ассимилируют многие свободно живущие виды микроорганизмов. Микроорганизмы могут не только усваивать атмосферный азот, но и разрушать белки до аминокислот и далее — до аммиака (аммонификация). Другие микроорганизмы восстанавливают нитраты до свободного азота (денитрификация), сульфаты — до сероводорода, двухвалентное железо превращают в трехвалентное и т. д.

В ходе исследования протекающих в природе микробиологических процессов сложились обширные познания о многообразии вызываемых микроорганизмами процессов. Это дает возможность использовать культуры микроорганизмов в контролируемых условиях для получения определенных веществ.

В природе микроорганизмы встречаются везде, причем в огромных количествах. В каждом грамме почвы содержатся иногда миллиарды микроорганизмов. В каждом миллилитре речной воды и бродящего сока имеются миллионы микроорганизмов. Микроорганизмы, которые питаются органическими остатками, называют сапрофитами. Паразиты используют для питания вещества живых организмов.

К наиболее часто встречающимся в природе и широко используемым в микробиологической промышленности группам относятся микроскопические грибы (дрожжи или плесени), актиномицеты или лучистые грибы, а также бактерии. Размеры их клеток обычно находятся в пределах 0,5—10 мкм, они хорошо видны в световых микроскопах.

Сравнение размеров микроорганизмов с другими биологическими объектами дано в табл. 1.

В среде, содержащей все необходимые питательные вещества, микроорганизмы растут и размножаются. Если к жидкой питательной среде, например бульону или пивному суслу, добавить агар или желатин, она затвердевает. В пробирках и чашках Петри на поверхности твердой питательной среды невооруженным глазом можно наблюдать как образуются и растут

Рис. 1. Колонии микро-  
а — *Penicillium rotatum*, б —  
колонии микроризовых  
грибов в вазе

колонии микроорганизмов и скорости их увеличения. Возбудителями заболеваний являются бактерии, вирусы, грибы, простейшие, паразитические черви. Электронного



Таблица 1. Линейные размеры биологических объектов

Биологические объекты	Размеры, м	Единицы измерения длины	Возможность различения
Животные, растения	1—10	м	Невооруженным глазом
	$10^{-1}$	дм	»
	$10^{-2}$	см	»
Животные, растения, колонии микроорганизмов, мицелий грибов	$10^{-3}$	мм	Невооруженным глазом, с лупой
Клетки, микроорганизмы	$10^{-4}$	100 мкм	Оптическим микроскопом
	$10^{-5}$	10 мкм	
	$10^{-6}$	1 мкм	
Вирусы, бактериофаги, структурные элементы, биополимеры, молекулы органических веществ	$10^{-7}$	100 нм	Электронным микроскопом
	$10^{-8}$	10 нм	
	$10^{-9}$	1 нм	
Атомы и положение групп атомов	$10^{-10}$	0,1 нм	Рентгеноструктурным анализом

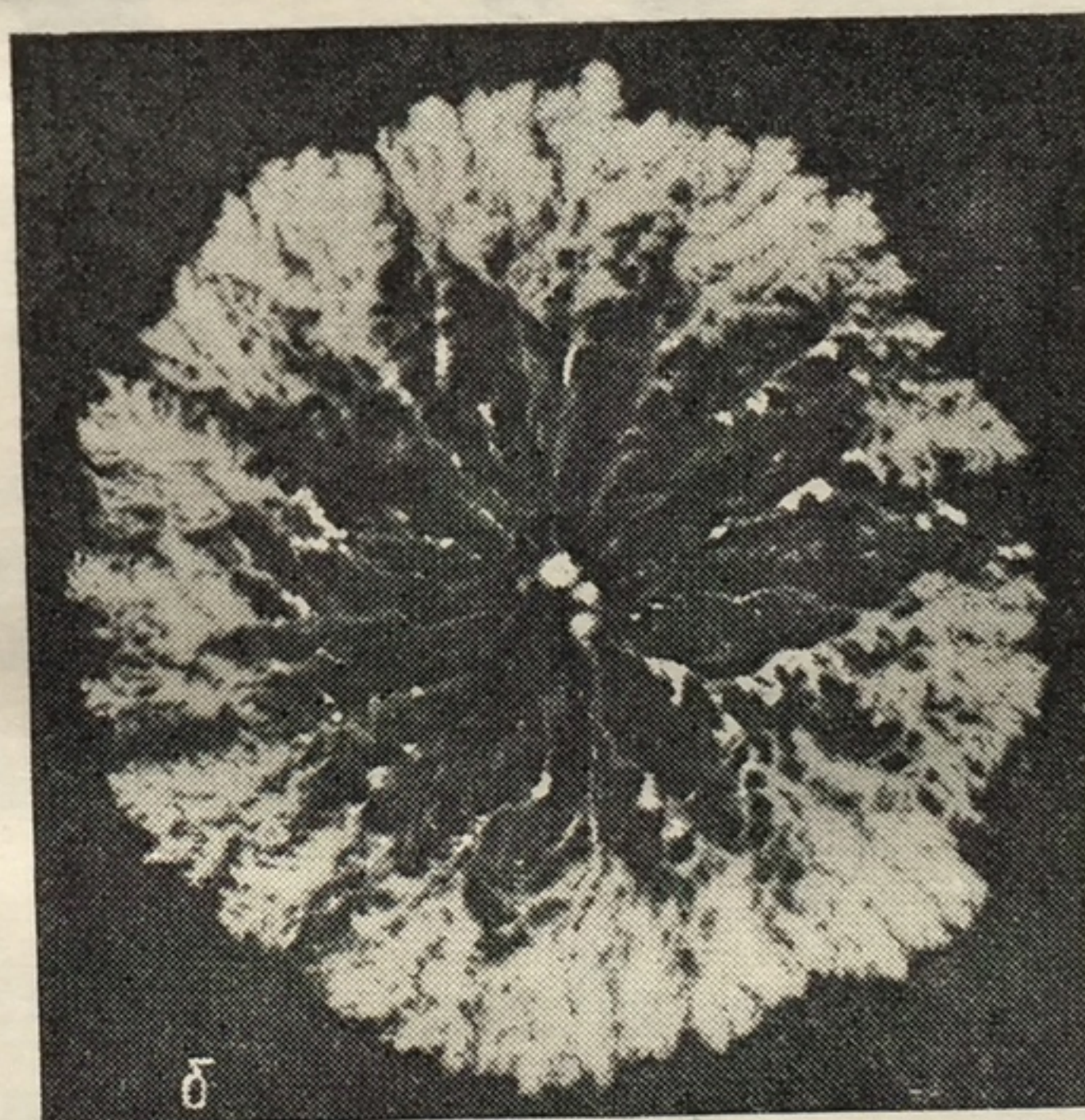
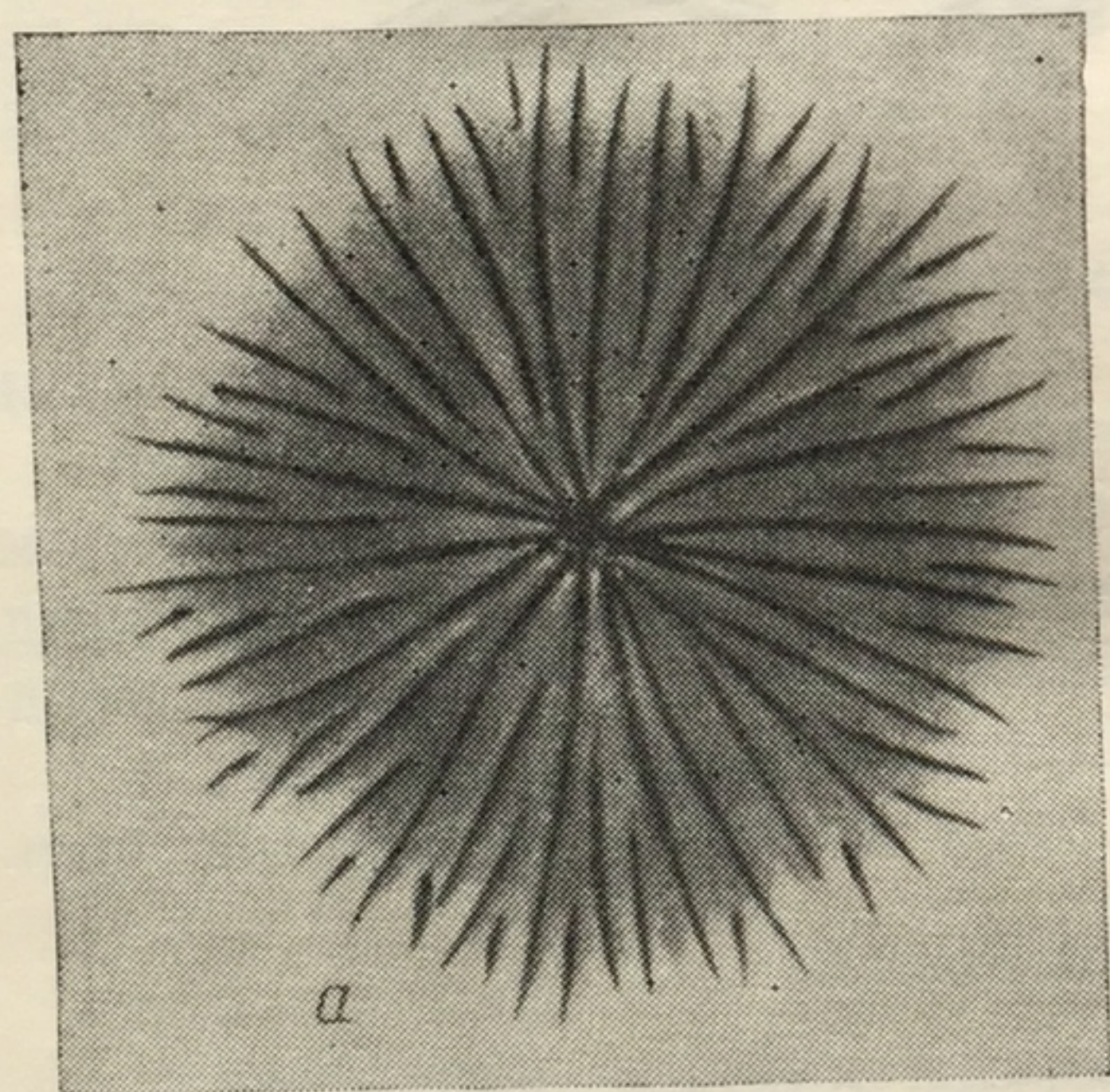


Рис. 1. Колонии микроорганизмов:  
а — *Penicillium rotatum*, б — *Bacillus mycoides*

колонии микроорганизмов (рис. 1). По форме, окраске колоний, их величине и скорости роста можно судить о систематической принадлежности микроорганизмов.

Возбудителями многих болезней человека, животных и растений являются вирусы. Их можно рассмотреть только с помощью электронного микроскопа, так как размер вирусов колеб-



лется от 10 до 400 нм. В клетках бактерий паразитируют бактериофаги, или вирусы бактерий. Они тоже не видны в обычном световом микроскопе.

Для обозначения культуры микроорганизмов используют латинские названия рода и вида, за которыми указывают номер

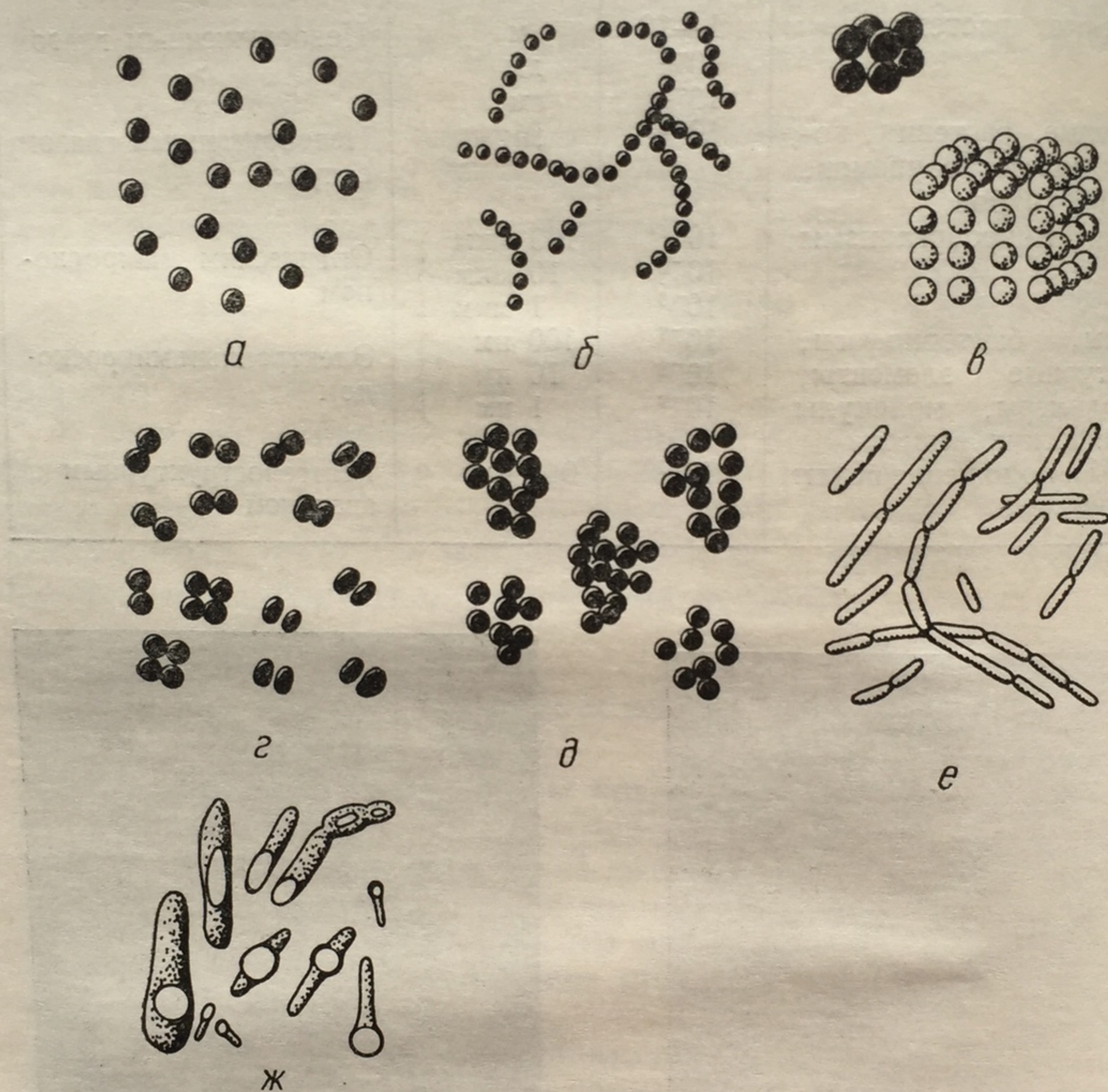


Рис. 2. Бактерии:

а — микрококки, б — стрептококки, в — сарцины, г — диплококки и тетракокки, д — стафилококки, е — палочки, ж — спороносные палочки

штамма или обозначение, например *Saccharomyces cerevisia* Томская 7 или раса 12.

Бактерии могут быть шаровидные, палочковидные и спиральные. Если шаровидные бактерии (кокки) расположены в группе по две, их называют диплококками, в группы по четыре — тетракокками, в группы по восемь — сарцинами, цепочками — стрептококками.

Рис. 3. Частично авто...  
ка *Proteus vulgaris* с...

Палочковидные...  
циллами (рис. 2)  
Клетки дрож...  
монообразными  
длинные нитеви...  
друг с другом  
у некоторых  
ный аппарат —

Улучшение...  
окраски клеточ...  
кроскопов дал...  
структурные э...  
тах строение к...  
наково (табл...  
От внешне...  
находится цит...  
жит организм...  
и т. д. (рис. 4)  
рода 5.



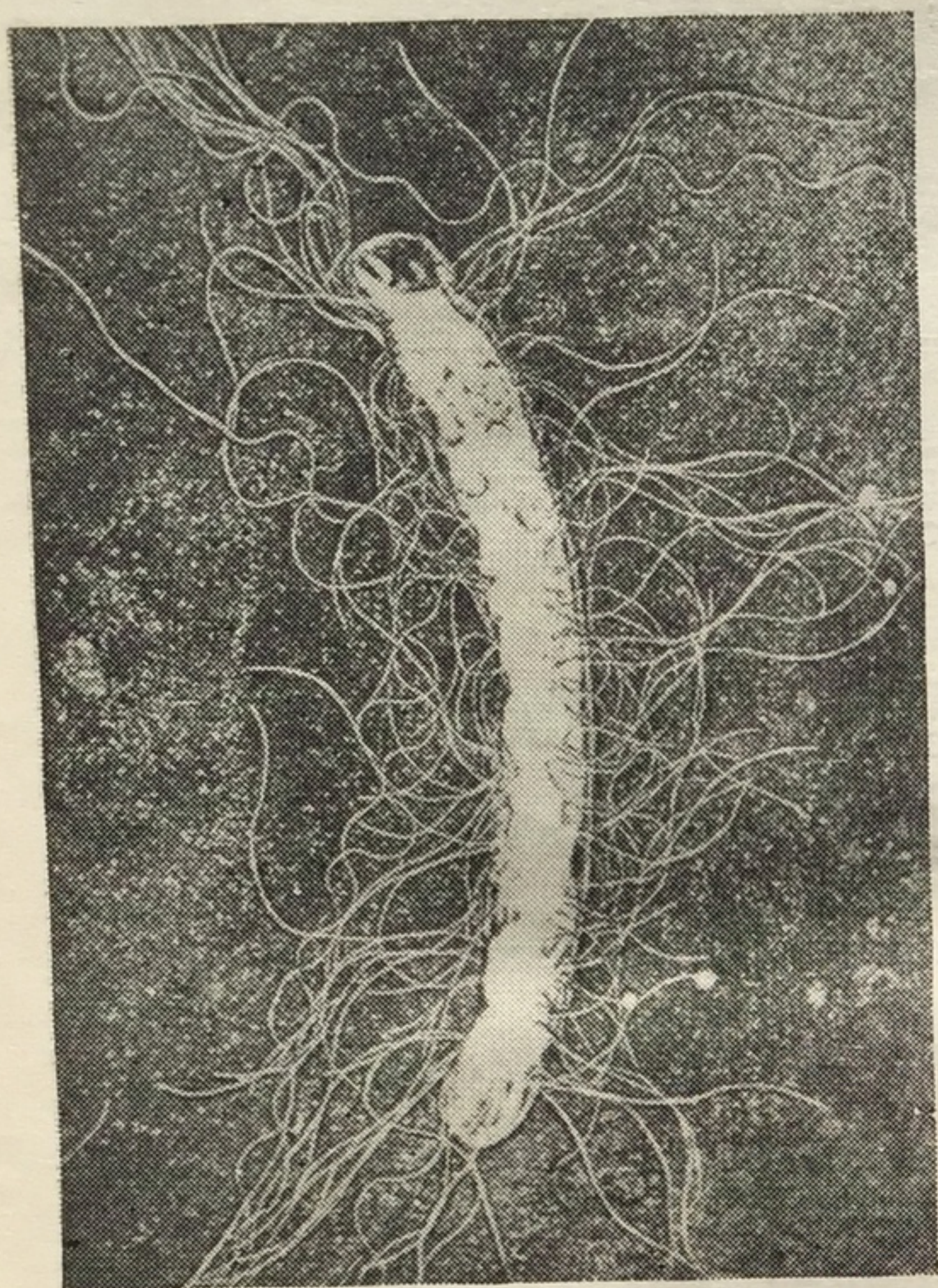


Рис. 3. Частично автолизированная клетка *Proteus vulgaris* со жгутиками



Рис. 4. Электронномикроскопическое изображение среза участка клетки *Bacillus subtilis*

Палочковидные бактерии, образующие споры, называют бациллами (рис. 2).

Клетки дрожжей могут быть круглыми, продолговатыми, лимonoобразными или сильно удлинёнными. Плесени образуют длинные нитевидные мицелии, которые часто переплетаются друг с другом (см. приложение 4).

У некоторых видов бактерий имеется специальный двигательный аппарат — жгутики (рис. 3).

#### СТРУКТУРА КЛЕТКИ

Улучшение техники микроскопирования, разработка методов окраски клеток, появление люминесцентных и электронных микроскопов дало возможность подробнее изучить строение и структурные элементы клеток микроорганизмов. В общих чертах строение клеток животных, растений и микроорганизмов одинаково (табл. 2).

От внешней среды клетку отделяет оболочка 2, под которой находится цитоплазматическая мембрана 3. Цитоплазма содержит органоиды — ядро 1, митохондрии, мезосомы 4, рибосомы и т. д. (рис. 4). На рисунке показана растущая клеточная перегородка 5.



Таблица 2. Структурные элементы клетки и их характеристика

Структурные элементы	Биохимическая активность	Функционально важные вещества и системы, образующие соответствующий структурный элемент
Ядро и его аналоги	Хранение генетической информации. Репликация ДНК. Образование информационных РНК (транскрипция)	ДНК, белки и ферменты, связанные с образованием ДНК и РНК
Митохондрии и их аналоги	Энергетический центр клетки. Образование АТФ. Дыхание. Окисление питательных веществ и др.	Мембраны. Ферменты цикла Кребса и дыхательной цепи
Рибосомы	Трансляция. Синтез белка	РНК. Белки
Лизосомы	Разрушение биополимеров	Мембраны, ферменты
Комплекс Гольджи	Экскреция, образование мембран и возможно оболочки клетки	Мембраны, ферменты
Вакуоли	Накопление резервных и ненужных клетке веществ	То же
Гранулы	Резервные вещества	Волютин (РНК, белки, полифосфаты, гликоген, липиды) Мембраны, ферменты
Эндоплазматическая сеть	Синтез липидов, углеводов и других веществ	То же
Цитоплазматическая мембрана (плазмолемма)	Транспорт и проницаемость веществ	Полисахариды. Белки, липиды и др.
Клеточная стенка	Механический барьер. Транспорт веществ	

Клеточная стенка дрожжей, например, составляет примерно 15% массы клетки, ее толщина достигает 400 нм. В состав клеточной стенки входят белково-полисахаридные комплексы и липиды. Примерно 70% сухой массы клеточной стенки дрожжей составляют полисахариды маннан и глюкан. Именно полисахариды играют большую роль в сохранении ее механической прочности.

Основу клеточной стенки бактерий образует гликопептид мууреин. Этот полимер состоит из N-ацетилглюкозамина, N-ацетилмурамовой кислоты и бактериальных липидов особого состава. В состав пептидов клеточной стенки входят L-аланин, D-глутаминовая кислота, мезодиаминопимелиновая кислота или L-лизин и D-аланин. Диаминопимелиновая кислота, лизин, а иногда ар-



гинин и диаминомасляная кислота связывают гетерополимерные цепи. От этих веществ зависит механическая прочность клеточной стенки. В основе действия многих антимикробных средств лежат реакции взаимодействия с этими характерными только для микроорганизмов соединениями — диаминопимелиновой кислотой и D-аминокислотами.

Количество белков в клеточной стенке обычно не превышает 13% общей массы оболочки клеток. Установлено, что часть белков клеточной стенки находится в виде ферментов.

Содержание липидов в клеточной стенке дрожжей составляет от 1 до 10% общего количества биомассы. Фракцию липидов образуют жирные кислоты, фосфолипиды, стеролы. Обычно липидные молекулы ориентированы перпендикулярно по отношению к поверхности клетки и образуют гидрофобные микроканалы, которые, возможно, играют важную роль в транспорте водонерастворимых веществ, например в проникновении парафина в клетку. Существует мнение, что компоненты клеточной стенки влияют на окраску препаратов микроорганизмов по Граму. В зависимости от того, окрашивается после этой обработки соответствующая культура или нет, все микроорганизмы делят на *грамположительные* (окрашиваются) или *грамотрицательные* (не окрашиваются). Очень важными компонентами клеточной стенки, влияющими на проницаемость, являются тейхоевые кислоты — полимеры, образуемые рибофосфатами либо глицерофосфатами.

Химический состав клеточной стенки микроорганизмов различных групп неодинаков. Он изменяется и в зависимости от условий культивирования. Механически и химически клеточная стенка является очень прочным образованием. Она сохраняет форму клетки и поддерживает нужное осмотическое давление в ней, а также принимает участие в транспорте веществ. В отличие от цитоплазматической мембраны клеточная стенка проницаема для солей и других низкомолекулярных соединений.

В научных исследованиях, а также в биохимической технологии часто необходимо разрушить клеточную стенку. Для этих целей используют механические дезинтеграторы, ультразвук, литические ферменты. Полученную после такой обработки массу, содержащую активные ферменты и неразрушенные структурные элементы клетки, называют клеточным гомогенатом.

Цитоплазматическая мембрана отделяет протоплазму от клеточной стенки. Она рассматривается как главный определитель осмотического давления, транспорта веществ и проницаемости в клетке. Поверхность цитоплазматической мембраны складчатая, ее толщина 8 нм. В настоящее время господствует мнение, что цитоплазматическая мембрана построена из бимолекулярного



слоя липидов, в котором свободно плавают белковые молекулы или их комплексы. Это так называемая «мозаичная» структура построения цитоплазматической мембраны. В бимолекулярном липидном слое благодаря гидрофобному взаимодействию молекул фосфолипидов полярные части их молекул обращены к внешней поверхности, а гидрофобные части молекул липидов — к внутренней поверхности слоя. При этом как фосфолипиды, так

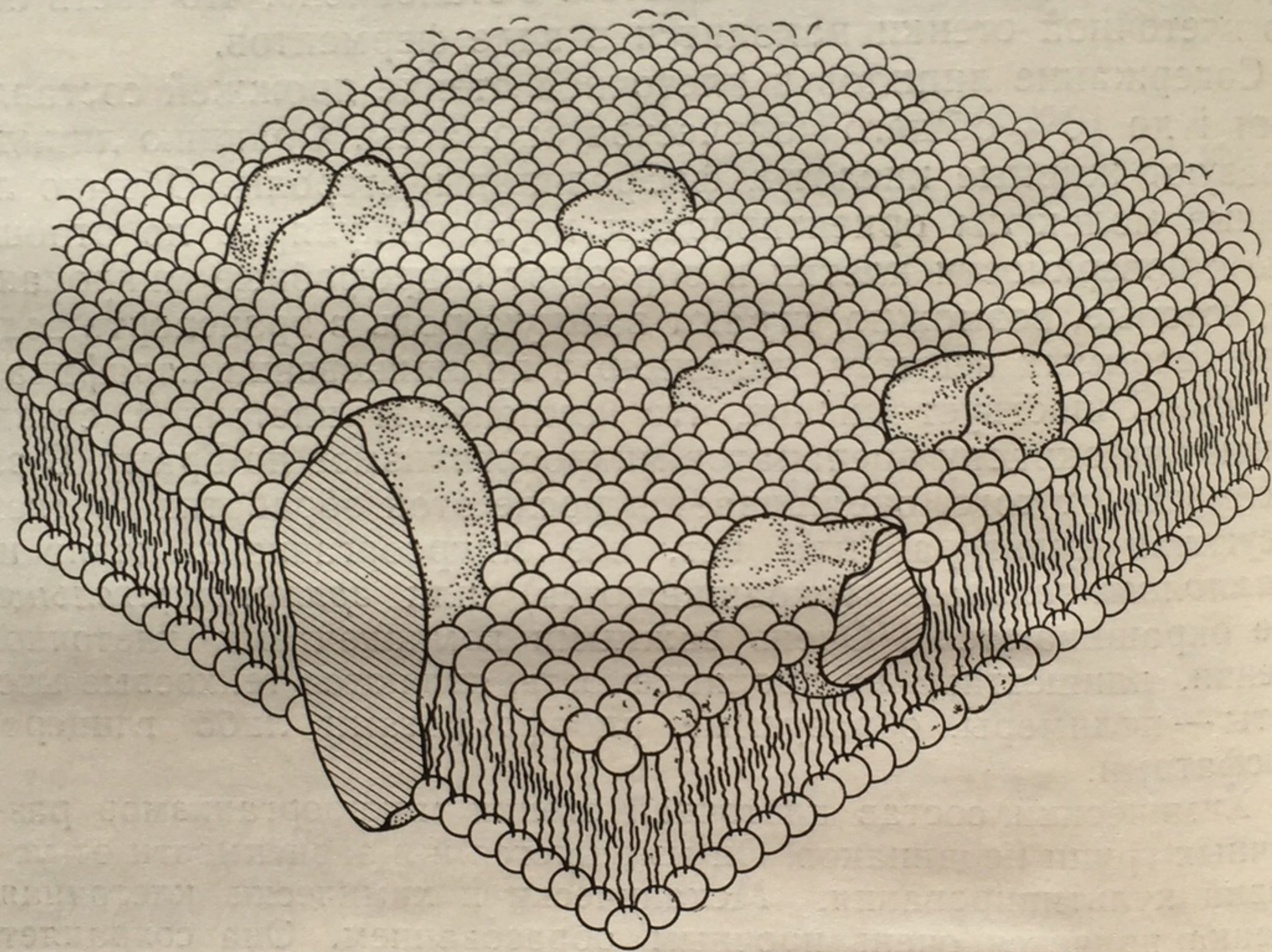


Рис. 5. Мозаичная модель клеточной мембраны: маленькие шарики с хвостами — липиды, большие комки неправильной формы — белки

и молекулы белков находятся в непрерывном движении и взаимодействии. В активном состоянии мембрана имеет жидкую консистенцию, а последняя в свою очередь зависит от соотношения насыщенных и ненасыщенных жирных кислот в мембране.

По этому принципу образованы все клеточные мембраны (рис. 5).

Транспорт веществ через цитоплазматическую мембрану обеспечивают механизмы, из которых далеко не все изучены. Сравнительно легко понятна диффузия веществ по градиенту концентрации. Так как клеточной мембране присуще свойство полупроницаемости, вещества могут попасть в клетку, если их концентрация в клетке ниже, чем в окружающей среде. Одно-



молекулы  
структура  
улярном  
моле-  
щены к  
идов —  
иды, так

временно в клетке постоянно наблюдается дефицит этих веществ, так как попавшие в клетку вещества сразу же используются в различных ферментативных реакциях, таким образом клетка работает как насос. Однако поступление веществ в клетку не всегда можно объяснить только законами простого осмоса или диффузии, например из катионов в клетке обычно преобладает калий, а в окружающей среде — натрий, из анионов — органические анионы, а во внешней среде — неорганические.

Транспорт углеводов зависит от их строения, положения Н- и ОН-групп, а также от степени асимметричности. Если к суспензии дрожжей добавить сахар, его концентрация выравнивается за 20—60 мин. Распределение вещества между клетками и окружающей средой характеризует коэффициент распределения. Если в состоянии равновесия концентрация вещества в клетках и окружающей среде одинакова, коэффициент распределения равен 1. Транспорту веществ может помешать присутствие какого-либо другого вещества, в этом случае мы имеем дело с антагонизмом веществ. Так, проникновению глюкозы в клетку мешает галактоза, а галактозы — мальтоза и т. д.

Аминокислоты очень легко проникают в клетку. Доказано, что содержание аминного азота в клетках значительно выше, чем в среде. Коэффициент распределения аминокислот равен 200—900. Транспорт аминокислот нельзя объяснить законами простой диффузии. Надо полагать, что имеет место активный транспорт веществ, в котором участвуют особые переносящие вещества — пермеазы. Транспорт аминокислот через мембраны связан с потреблением энергии. В аминокислотном транспорте также наблюдается антагонизм — валин мешает проникновению фенилаланина; аланин, лейцин, гистидин мешают проникновению глицина. D-Формы аминокислот менее антагонистичны по своим свойствам, чем L-формы. Микроэлементы в клетках могут накапливаться в больших количествах, чем в окружающей среде.

Транспорт веществ возможен также посредством пиноцитоза. Цитоплазматическая мембрана способна образовывать складки, инвагинации, которые захватывают частички веществ. После этого пиноцитозный пузырек с заключенным в нем веществом отходит от мембраны, попадает в протоплазму, где мембрана пузырька разрушается и вещество переходит в протоплазму.

Проницаемость клеток зависит и от условий культивирования. Установлено, что содержание биотина в питательной среде меняет проницаемость мембран. Это явление используют при получении глутаминовой кислоты, чтобы обеспечить выделение этой синтезированной в клетке кислоты через мембрану в окружающую среду.



Внутренняя поверхность цитоплазматической мембраны граничит с цитоплазмой, которая представляет собой коллоидный раствор углеводов, аминокислот, ферментов, минеральных и других веществ в воде. Вязкость цитоплазмы в 800 раз выше вязкости воды. При старении клеток вязкость цитоплазмы увеличивается, в ней появляются мелкие гранулы и вакуоли. В цитоплазме находятся важнейшие клеточные органоиды — ядро, митохондрии, рибосомы, эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи и др. В них протекают все ферментативные процессы жизни.

Эндоплазматическая сеть представляет собой мембранное образование, которое в виде мелких канальцев или пузырьков локализуется в любом месте цитоплазмы. Обычно она связана с цитоплазматической мембраной и нуклеолеммой. Эндоплазматическая сеть содержит около 50% липидов. Своей обширной мембранной поверхностью это образование в клеточной цитоплазме как бы изолирует и локализует различные ферментные системы, которые катализируют синтез липидов, углеводов и других веществ.

Этот структурный элемент, надо полагать, частично организует и направляет транспорт веществ в клетках. На эндоплазматической сети расположены рибосомы.

Комплекс Гольджи — мембранное образование, которое морфологически связано и с эндоплазматической сетью, и с нуклеолеммой. Он участвует в выводе вредных веществ из клетки, обеспечивает транспорт веществ между другими структурными элементами и участвует в образовании новых структурных элементов, например мезосом. В них локализуются ферменты, катализирующие разрушение биополимеров.

Митохондрии — сравнительно большие, несколько изогнутые палочковидные структуры, длина которых достигает 1500 нм, а диаметр — 500 нм. Митохондрии покрывает оболочка, которая состоит из двух мембран. Между мембранами находится водянистая жидкость. Внутренняя мембрана образует большие складки — кристы, или септы, которые значительно увеличивают общую поверхность мембраны (рис. 6). Как внешняя, так и внутренняя мембраны состоят из белков (80%) и липидов (20%), главным образом из фосфолипидов. В составе митохондрий обнаружены полифосфаты, РНК и ДНК.

Доказано, что митохондрии являются автономными структурами в клетке, которые размножаются самостоятельно, реплицируя митохондриальную ДНК и продуцируя свои специфические белковые вещества. В синтезе белков митохондриальных мембран участвуют и нуклеиновые кислоты ядра и рибосомы клетки.



На поверхности внутренней мембраны обнаружены особые частицы, которые, как полагают, участвуют в переносе электронов.

На поверхности внешней мембраны происходят окислительные реакции трикарбоновых кислот или цикла Кребса и окисление жирных кислот. Следовательно, именно здесь протекает большинство реакций, которые дают энергию и исходные вещества для клеточного роста и синтеза органических веществ. Электроны, которые образуются в ходе окислительных реакций на поверхности внешней мембраны, с помощью НАД переносятся на поверхность внутренней мембраны. Получив электрон,  $\text{НАД}^+$  переходит в восстановленную форму  $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$ , которая, отдавая электроны мембранным частицам, снова окисляется. Эту реакцию катализирует фермент оксидаза. Далее электрон передается кислороду, который в процессе аэробного окисления является акцептором протонов. В переносе электрона от  $\text{НАД} \cdot \text{H}_2$  к молекулярному кислороду участвуют 11 различных соединений, которые объединены в четыре комплекса. Комплексы отделены один от другого липидными слоями. Последние этапы переноса электронов катализируют цитохромы. В результате деятельности митохондрий на каждую перенесенную пару электронов образуется три молекулы АТФ. Эти молекулы АТФ являются универсальным источником энергии для любых жизненных процессов в клетке.

Форма и строение митохондрий у различных микроорганизмов неодинаковы. Даже у одной и той же культуры при различных условиях и фазах роста форма и величина митохондрий меняется. В клетках дрожжей, перенесенных из аэробных условий в анаэробные, митохондрии теряют выраженную форму и образуются мембраны неопределенной формы. В бактериях функцию митохондрий выполняют особые образования цитоплазматической мембраны — мезосомы. Следовательно, в клетках бактерий аналогами митохондрий являются мезосомы. Как число митохондрий, так и число мезосом меняется, оно резко возрастает перед процессом деления клетки. Мезосомы бактерий специализируются в выполнении различных функций. Некоторые из них

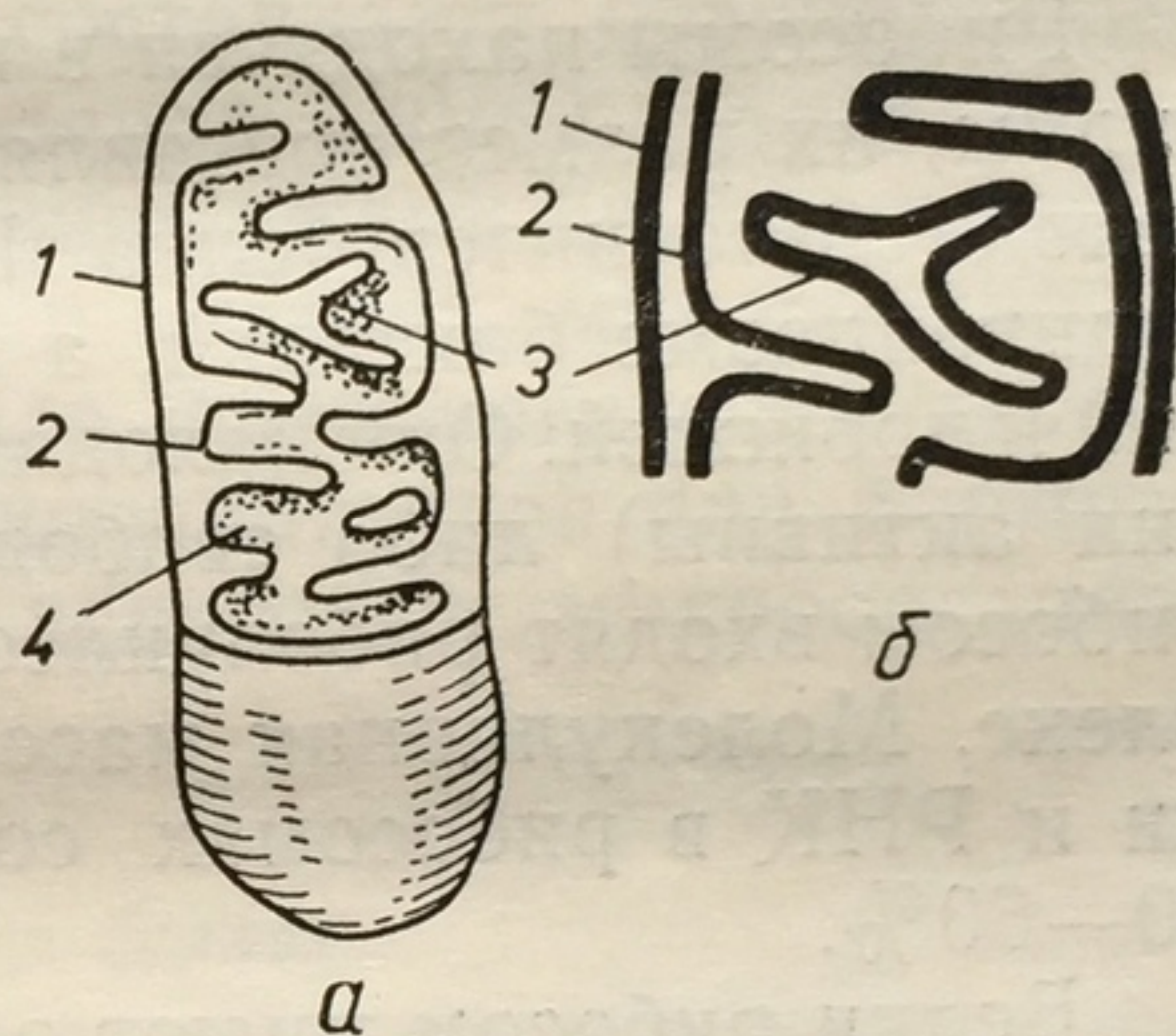


Рис. 6. Митохондрия:

а — схема строения, б — продольный разрез;  
1 — внешняя мембрана, 2 — внутренняя мембрана, 3 — кристы, 4 — матрикс



участвуют в обмене липидов и углеводов, другие — в образовании клеточной оболочки. Часть мезосом является аналогом центросом и связана с ядром или его аналогом — нуклеоидом. Отмечены даже мезосомы — аналоги комплекса Гольджи и лизосом (деятельность комплекса Гольджи в животных клетках связана с экскрецией; мезосомы богаты гидролитическими ферментами). Протекание жизненно важных процессов переноса энергии и веществ, следовательно, связано с мембранами, которые состоят из белков и фосфолипидов. Это очень важный признак живой клетки.

Изучение мембран теперь стало одним из основных вопросов молекулярной биологии.

Рибосомы находятся в цитоплазме клеток. Обычно они шаровидны, их размер составляет всего 15—35 нм. В рибосомах происходит биосинтез белка. В 1943 г. рибосомы были обнаружены в цитоплазме бактерий, а затем в цитоплазме животных, растений и дрожжей. Они находятся на поверхности мембраны (тогда они активны) либо свободно плавают в цитоплазме. В состав рибосом входят рибонуклеопротеиды, т. е. РНК и белковый комплекс. Молекулярная масса рибосом составляет около  $10^6$ . Белки и РНК в рибосомах содержатся в количестве примерно по 40—60%.

Белки рибосом имеют основной характер, в их составе преобладает лизин, аргинин и гистидин.

В клетках эукариотов ядра имеют различную форму и размеры. Их окружает оболочка, внешняя элементарная мембрана, которая связана с эндоплазматической сетью, цитоплазматической мембраной или мезосомами. В ядерной оболочке обнаружены сравнительно большие поры. Бактерии принадлежат к группе прокариотных микроорганизмов, у которых ядро не выражено, но имеется его аналог — нуклеоид или даже диффузное распределение ядерного вещества в протоплазме.

Главная составная часть ядра — ДНК, в которой закодирована информация о биосинтетических признаках клетки. ДНК составляет 1—2% сухой биомассы клеток. В ядре находятся также белки и РНК.

В клетках некоторых микроорганизмов имеются гранулы и вакуоли, т. е. образования, которые являются хранилищами резервных веществ клетки. Чаще всего резервные вещества находятся в них в виде волютина, жира или углеводов.

Все перечисленные выше структурные элементы встречаются в клетках высокоорганизованных микроорганизмов, например дрожжей. Структура бактерий гораздо примитивнее.

Клеточные органоиды микроорганизмов можно выделить из гомогената центрифугированием. Осаждение ядер происходит за

10 мин при ускорении 8  
ускорении 12 000 м/с<sup>2</sup>  
25 000 м/с<sup>2</sup>, микросом  
105 000 м/с<sup>2</sup>.

Сухая клеточная масса  
15—25% общей массы  
2—14% зольных веществ  
много калия, натрия, магния  
Из микроэлементов  
Со, Сг и др. Часть сухих  
элементов — углерод (40—45%)  
и водород (6—8%)  
приходится на белки (30—35%)  
и углеводы (10—15%)  
находятся главным образом  
в комплексах — нуклео-  
тидах. Аминокислотный состав  
приведен в табл. 3.

Таблица 3. Аминокислотный состав

Аминокислоты	Аминокислоты бактерий
Глицин	4,4
Валин	6,8
Лейцин	7,5
Изолейцин	7,5
Серин	7,0
Треонин	4,9
Цистеин	0,1
Метионин	1,3
Аспарагиновая кислота	11,1
Глутаминовая кислота	11,1
Пролин	11,1
Фенилаланин	11,1
Триптофан	11,1
Гистидин	11,1
Аргинин	11,1
Лизин	11,1



10 мин при ускорении  $800 \text{ м/с}^2$ , митохондрий — за 15 мин при ускорении  $12\,000 \text{ м/с}^2$ , лизосом — за 15 мин при ускорении  $25\,000 \text{ м/с}^2$ , микросом и мембран — за 60 мин при ускорении  $105\,000 \text{ м/с}^2$ .

### ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ КЛЕТОК

Сухая клеточная масса микроорганизмов составляет только 15—25% общей массы. Сжигая эти сухие вещества, получают 2—14% зольных веществ, в составе которых до 50% фосфора, много калия, натрия, магния, серы, кальция, хлора и железа.

Из микроэлементов в биомассе встречаются Mn, Zn, Mo, B, Co, Cr и др. Часть сухой биомассы составляют органогенные элементы — углерод (46—50%), кислород (30%), азот (7—14%) и водород (6—8%). Около половины сухой биомассы приходится на белки (30—80%), которые в клетках микроорганизмов находятся главным образом в виде физиологически активных комплексов — нуклеопротеидов, липопротеидов или ферментов. Аминокислотный состав белков некоторых микроорганизмов приведен в табл. 3.

Таблица 3. Аминокислотный состав различных белков

Аминокислоты	Содержание аминокислот в белке, %						
	молочно- кислых бактерий	метано- кисля- ющих бак- терий	плесневых грибов	хлореллы	дрожжей	казеина	глютамина пше- ницы
Глицин	4,4	5,8	3,5—4,9	6,2	4,2	2,0	1,0
Валин	6,8	6,2	5,1—6,5	5,5	4,6—7,1	7,0	3,0
Лейцин	7,5	7,9	7,4—7,7	6,1	6,1—8,5	9,2	—
Изолейцин	7,0	5,0	4,9—6,3	3,5	5,5—6,2	6,1	6,0
Серин	—	3,9	4,3—4,4	3,3	—	6,1	0,1
Треонин	4,9	4,9	4,1—5,1	2,9	5,1—6,0	4,5	3,0
Цистеин	0,1	—	1,0—1,5	—	0,9	0,3	2,3
Метионин	1,3	3,0	1,8—2,8	1,4	2,6—2,8	2,9	2,3
Аспарагиновая кис- лота	—	9,1	6,9—9,3	6,4	—	7,1	1,4
Глутаминовая кислота	11,1	13,8	4,5—11,0	7,8	14,0—14,7	22,2	46,0
Пролин	—	3,8	3,9—4,8	—	—	11,0	13,2
Тирозин	—	3,8	2,6—3,5	2,8	3,4—6,0	6,2	3,1
Фенилаланин	4,1	5,2	4,4—5,6	2,8	2,9—4,6	5,5	2,5
Триптофан	0,6	2,7	1,8	—	1,2—1,5	1,2	0,9
Гистидин	2,4	1,6	1,9—10,7	3,3	2,3—3,3	2,9	2,1
Аргинин	4,8	5,1	5,3—8,0	15,8	3,1—5,4	4,0	3,2
Лизин	6,9	5,3	5,7—7,0	10,2	6,7—9,8	8,1	0,6



Как видно по составу аминокислот и их содержанию, белки микроорганизмов близки к казеину.

Микробная биомасса содержит 5—30% нуклеиновых кислот (РНК и ДНК). В состав молекулы ДНК входят пуриновые и пиримидиновые основания: гуанин (Г), аденин (А), тимин (Т), цитозин (Ц) и метилцитозин, причем аденин всегда связан с тимином, а гуанин — с цитозином. Соотношение  $\frac{Г+Ц}{А+Т}$  этих

гетероциклических пар оснований изменяется в зависимости от систематической принадлежности микроорганизма. Так,  $\frac{Г+Ц}{А+Т}$

ДНК человека равно 0,66, у пшеницы — 0,94, у дрожжей — 0,56, а у некоторых бактерий — 2,5. Содержание ДНК в клетках микроорганизмов за время культивирования изменяется сравнительно мало, в то время как содержание РНК в быстрорастущей культуре может увеличиться во много раз. У бактерий количество РНК в период размножения возрастает с 3—4 до 18—20%. В отличие от ДНК в молекуле РНК вместо тимина находится урацил.

Соотношение  $\frac{Г+Ц}{А+У}$  в РНК микроорганизмов более постоянно, чем в ДНК и обычно составляет 1,0—1,6. Пуриновые и пиримидиновые основания, их нуклеозиды или мононуклеотиды, такие, как инозиновая кислота, экономически выгодно получать путем микробиологического синтеза.

Клетки микроорганизмов — богатый источник витаминов, особенно группы В. Они содержат рибофлавин, тиамин, биотин, инозит и др. Некоторые бактерии (пропионовые, метанобразующие) и актиномицеты синтезируют витамин В<sub>12</sub>. В клетках дрожжей найден эргостерин (0,2—0,8%), облучая который, получают до 80 тыс. и.е. на 1 г витамина D<sub>2</sub>.

Ряд микроорганизмов содержит каротиноиды. Так, в дрожжах рода *Rhodotorula* 300—400 мкг/г β-каротина; в них имеются также липиды и углеводы. Иногда в клетках дрожжей накапливается 1,5—4% гликогена (крахмалоподобное вещество). В неблагоприятных условиях в клетках увеличивается содержание трегалозы. Специфические полисахариды микроорганизмов в виде слизи покрывают бактерии, находящиеся в неблагоприятных условиях (*Azotobacter*, *Leuconostoc*). Прочность клеточной стенке дрожжей придают полисахариды — глюкан (до 8% сухой массы), а также маннан (до 2% сухой массы).

Липиды в микробных клетках образуют биомембраны и накапливаются как запасные вещества. Некоторые дрожжи (*Rhodotorula gracilis*, *Endomyces vernalis*, *Torulopsis lipofera*) могут накопить до 50% липидов по сухой массе. В хлебопекарных и



пивных дрожжах количество липидов обычно не превышает 7%. Из стеридов в микроорганизмах встречается эргостерин. За время развития микроорганизмы выделяют многие вещества в окружающую среду.

Количество воды в клетках значительно превышает содержание всех остальных компонентов.

### РОЛЬ ВОДЫ В ПРОЦЕССАХ ЖИЗНЕДЕЯТЕЛЬНОСТИ

Содержание воды в клетках достигает 65—80%. В протоплазме на каждую молекулу белка приходится около 1800 молекул воды, причем состав ее в клетках непрерывно обновляется. В зависимости от условий культивирования содержание воды в клетках может меняться. Часть воды находится в межклеточном пространстве, это внеклеточная вода, а часть воды находится в самих клетках. В свою очередь находящаяся в клетках вода может быть в свободном и в связанном с поверхностью макромолекул виде.

В биологических системах связанной называют воду, которая прочно связана с поверхностью макромолекул биополимеров. Каждый грамм ДНК связывает 0,45 г воды, которая образует гидратный слой толщиной 0,3 нм. 1 г яичного альбумина связывает 0,25 г воды, образуя гидратный слой толщиной 0,25 нм. В микроорганизмах обнаружено примерно 15—18% связанной воды. В связи с присутствием макромолекул связанная вода значительно отличается по свойствам от обычной воды. Ее нельзя использовать в качестве растворителя веществ, она не замерзает даже при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Для связанной воды характерна пониженная электропроводность. Термодинамически эта вода мало отличается от льда. Связанную воду целесообразно рассматривать как структурный элемент, а не как среду.

Большую часть находящейся в клетке воды составляет свободная вода, которая является реакционной средой и растворителем веществ. При участии гидролитических ферментов она включается в множество реакций, в результате которых образуются новые вещества с совершенно новыми свойствами. Таким образом, вода является не только средой, в которой протекают все биохимические процессы, но и активным преобразователем веществ. Эти важные функции она осуществляет благодаря малой молекулярной массе и особенностям строения. Молекулы воды представляют собой диполи, которые взаимно притягиваются, вызывают распад других веществ на анионы и катионы и вместе с этим вещества, растворенные в воде, получают большую реакционную способность.



Из шести электронов наружного электронного слоя атома кислорода в молекуле воды два электрона химически связаны с атомами водорода, а четыре электрона, т. е. две электронные пары, остаются свободными и участвуют в образовании межмолекулярных водородных связей. По-видимому, некоторые группы белковых молекул связывают воду посредством водородных связей. В молекуле белка с помощью водородных связей уменьшается расстояние между соседними атомами. Вода участвует также в активации карбоксильных групп аминокислот, что необходимо для биосинтеза белков.

Нормальное функционирование клетки, т. е. обмен веществ, рост и размножение может происходить только тогда, когда в ней имеется достаточное количество воды и если клетки погружены в водную среду с растворенными в ней питательными веществами. При отделении клеток от питательной среды, например путем центрифугирования или фильтрования, обмен веществ продолжается до тех пор, пока в межклеточном пространстве имеется вода и в ней растворены питательные вещества. После их использования обмен веществ в клетках продолжается за счет клеточных резервов (углеводы, липиды) в том случае, если сохраняются оптимальные температура и реакция среды. Когда использованы и резервные вещества, начинается автолиз клеток — саморазрушение, в результате которого белки распадаются на аминокислоты и углерод аминокислот идет для энергетических нужд.

Изучение различных физических свойств биомассы клеток (парциальное давление паров воды, теплота испарения, диэлектрические постоянные и др.) показало, что при влажности биомассы свыше 20% вода полностью заполняет объем клетки и функционирует как непрерывная среда. При этих условиях в клетке могут свободно протекать все ферментативные процессы. Если биомасса содержит 10—20% влаги, то это в основном связанная вода. Клеточные коллоиды в данном случае переходят в гели и протекание всех ферментативных процессов затруднено. Если влажность биомассы еще ниже — 5—10%, ее физические свойства резко изменяются, но и при этих условиях, можно полагать, еще возможен обмен между молекулами воды и некоторыми веществами на близлежащих участках. Если влажность биомассы менее 5%, вода в клетке локализуется в пределах определенных структурных элементов. При таком обезвоживании биомассы микробной культуры часть клеток повреждается и инактивируется. Инактивация клеток имеет место и при хранении сухих микробных препаратов. В то же время в сухом виде жизнеспособность клеток сохраняется гораздо дольше — до нескольких лет, так как из-за низкого содержания воды все реак-

или протекают  
их микробных  
влажность культуры — тип обмена  
культуры — тип обмена  
хранения обычно не

вода

+

вещества,  
пригодные  
для обмена

+

биологические  
структурные  
элементы

Рис. 7. Значение воды в жизни  
При уменьшении содержания воды в биохимических реакциях процессов. В сухих препаратах, где



ции протекают очень медленно. Обычно содержание влаги в сухих микробных препаратах колеблется от 3 до 12%. Чем меньше влажность культуры, тем дольше можно ее хранить. Свойства культуры — тип обмена веществ — в период обезвоживания и хранения обычно не изменяются.

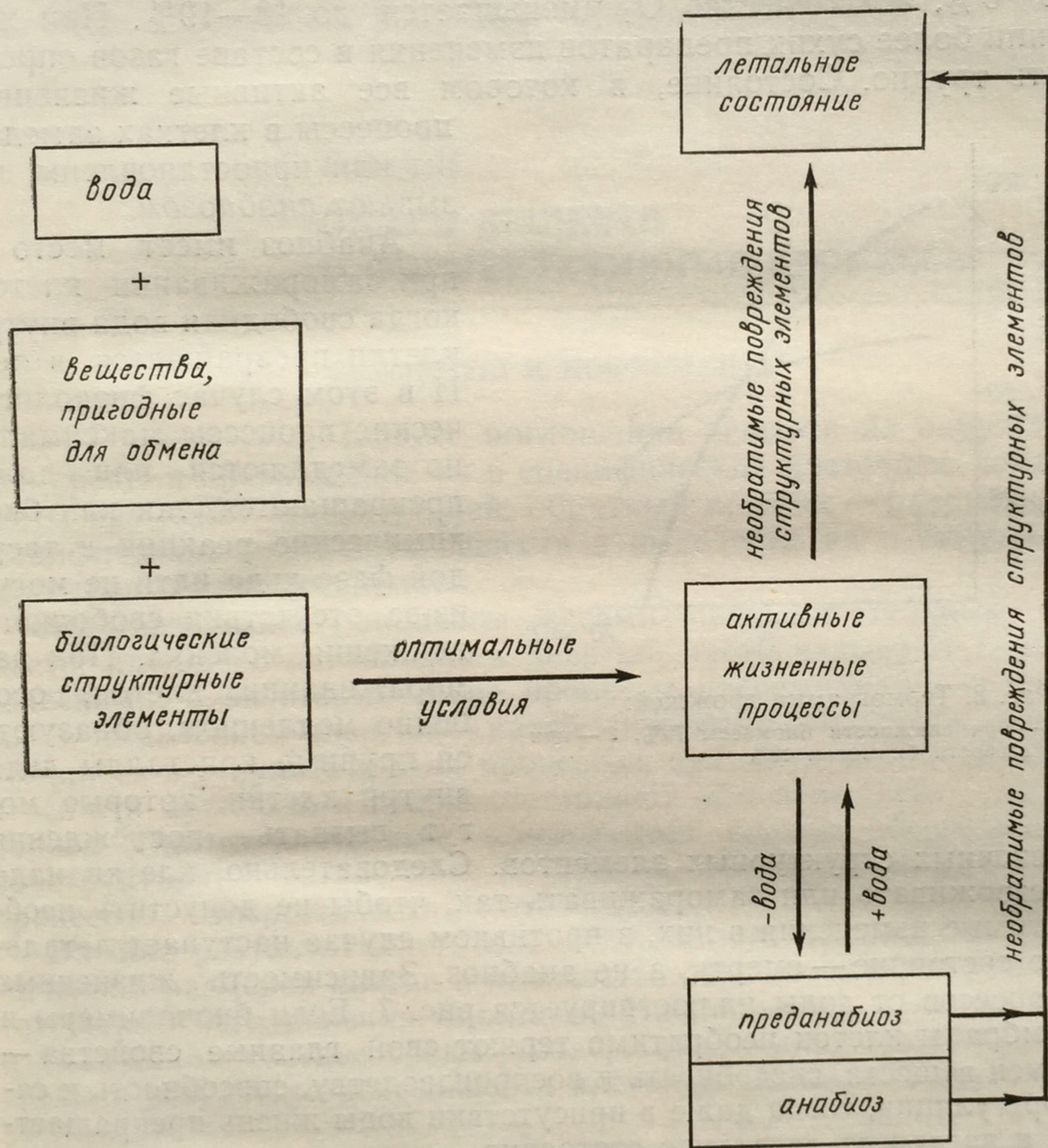


Рис. 7. Значение воды в жизненных процессах

При уменьшении содержания воды снижается интенсивность биохимических реакций, а следовательно, и интенсивность жизненных процессов. В настоящее время неизвестно, можно ли полностью остановить обмен веществ в клетке. В сухих микробных препаратах, где содержание влаги 3—12%, наблюдается вы-



ции протекают очень медленно. Обычно содержание влаги в сухих микробных препаратах колеблется от 3 до 12%. Чем меньше влажность культуры, тем дольше можно ее хранить. Свойства культуры — тип обмена веществ — в период обезвоживания и хранения обычно не изменяются.

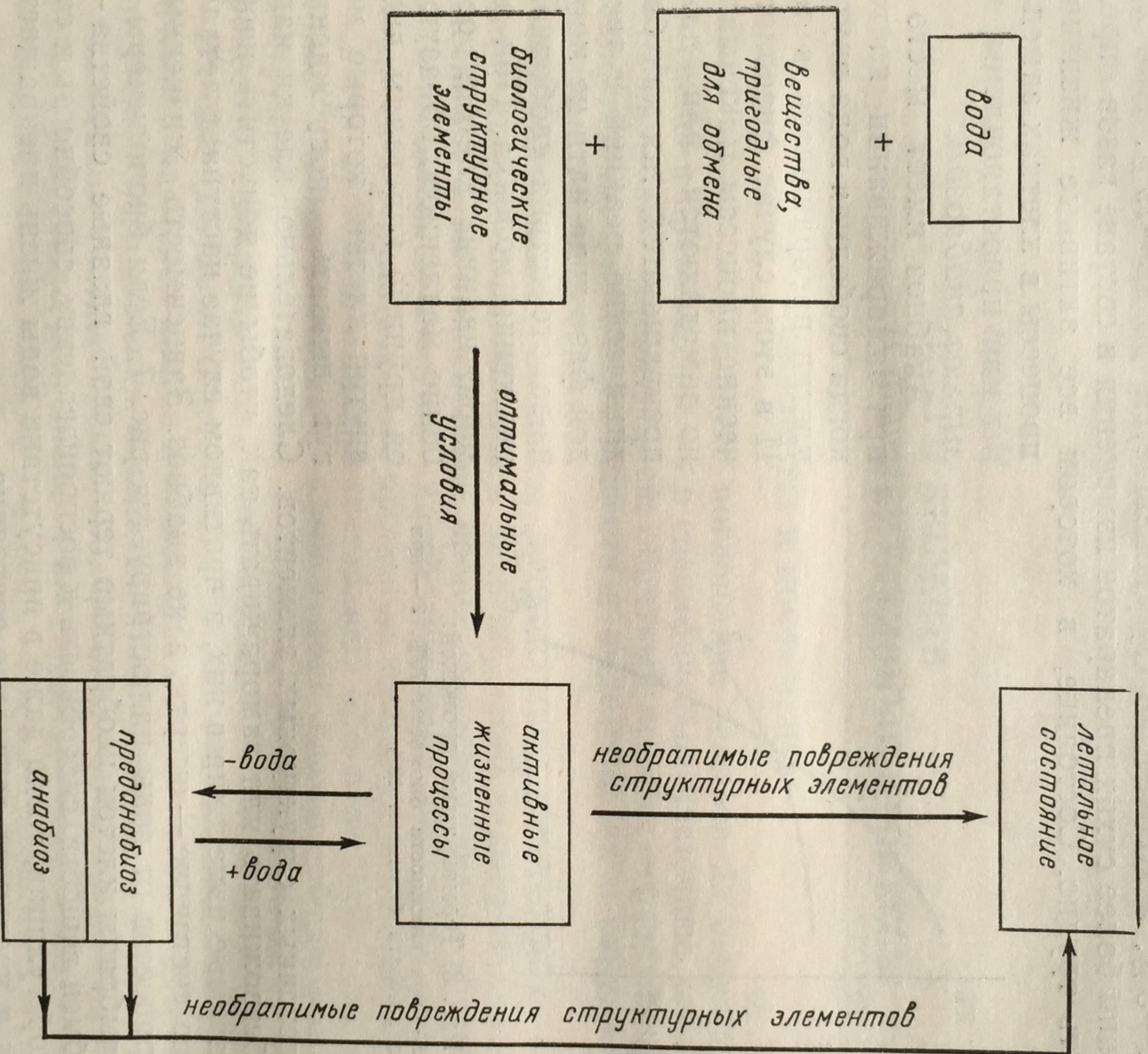


Рис. 7. Значение воды в жизненных процессах

При уменьшении содержания воды снижается интенсивность биохимических реакций, а следовательно, и интенсивность жизненных процессов. В настоящее время неизвестно, можно ли полностью остановить обмен веществ в клетке. В сухих микробных препаратах, где содержание влаги 3—12%, наблюдается вы-



деление  $\text{CO}_2$  и уменьшение количества сухой массы. Это можно наблюдать, храня сухие хлебопекарные дрожжи, например, в герметических сосудах при температуре  $30^\circ\text{C}$ . Уже через 2 нед такого хранения в сосудах, содержащих дрожжи влажностью 10—12%, количество  $\text{CO}_2$  увеличивается почти в 10 раз, т. е. до 2,5—3%, а количество  $\text{O}_2$  уменьшается до 18—19%. При хранении более сухих препаратов изменения в составе газов определить трудно. Состояние, в котором все активные жизненные

процессы в клетках замедлены или приостановлены, называют *анабиозом*.

Анабиоз имеет место и при замораживании клеток, когда свободная вода внутри клетки превращается в лед. И в этом случае физиологические процессы максимально замедляются или даже прекращаются, так как биохимические реакции в твердой фазе льда идти не могут из-за отсутствия свободного движения молекул. При замораживании клеток, особенно медленном, образуются крупные кристаллы льда внутри клетки, которые могут вызвать повреждения

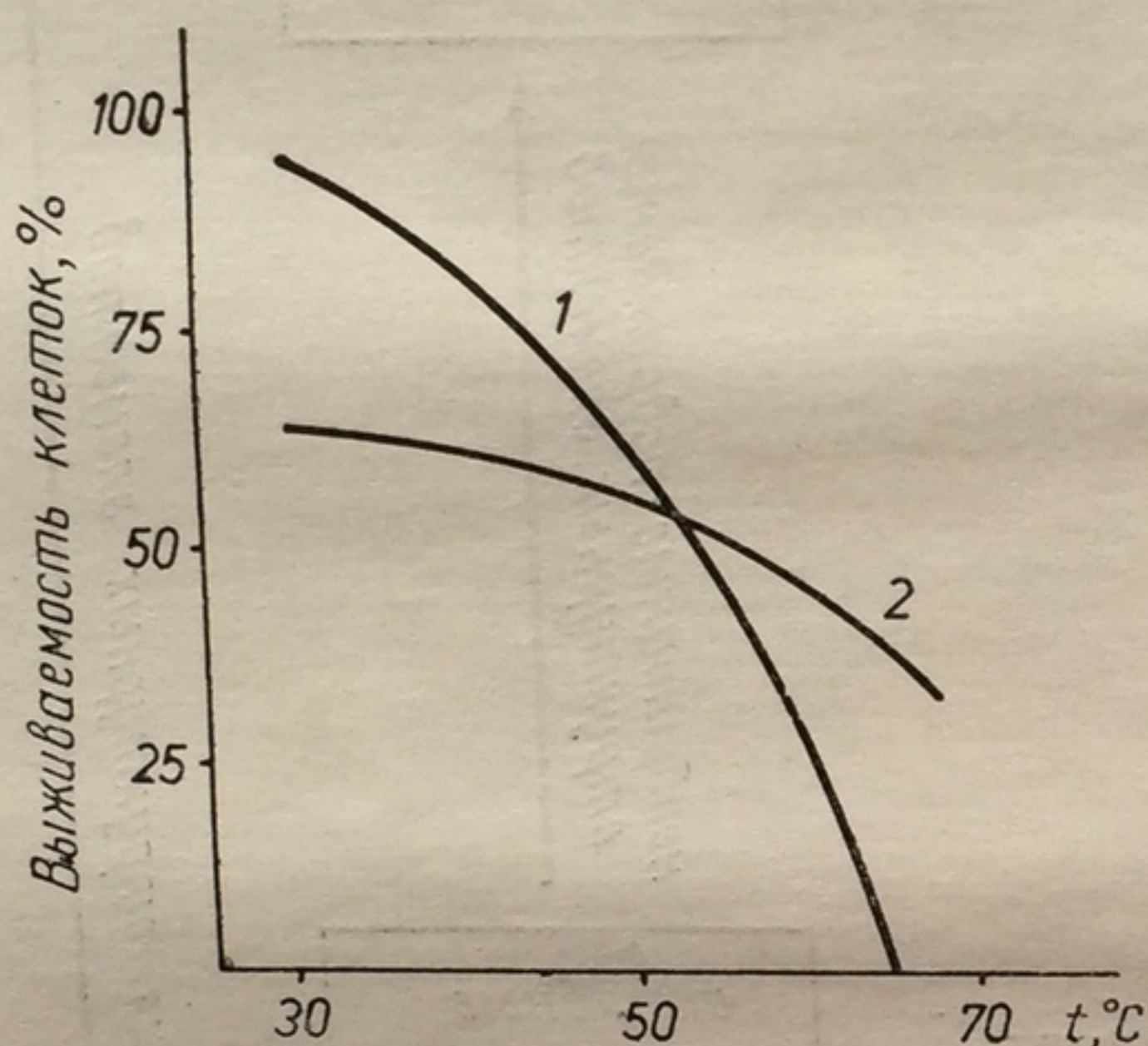


Рис. 8. Термограмма дрожжей:  
1 — при влажности биомассы 70%, 2 — при влажности биомассы 10%

клеточных структурных элементов. Следовательно, клетки надо обезвоживать или замораживать так, чтобы не допустить необратимые изменения в них, в противном случае наступает летальное состояние — смерть, а не анабиоз. Зависимость жизненных процессов от воды иллюстрируется рис. 7. Если биополимеры и мембраны клеток необратимо теряют свои главные свойства — обмен веществ, способность к воспроизводству, способность к саморегуляции, тогда даже в присутствии воды жизнь прекращается и наступает летальное состояние.

Обезвоженные или замороженные клетки микроорганизмов более выносливы к воздействию таких факторов, как температура, радиация и др.

Термочувствительность дрожжей *Candida* при содержании влаги 70 и 10% в температурном интервале от  $30$  до  $70^\circ\text{C}$  (длительность воздействия 3 ч) показана на рис. 8 в виде кривой — термограммы.



Из термограммы видно, что дрожжи влажностью 70% быстро инактивируются и при 65°C все клетки погибают, в то время как дрожжи влажностью 10% при этой температуре сохраняют 30—40% живых клеток.

Доказано, что сухие или замороженные культуры сохраняют свою жизнеспособность в течение тысячелетий.

## Глава II

# ОБМЕН ВЕЩЕСТВ И ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ

## ФЕРМЕНТЫ И КОФЕРМЕНТЫ

Процесс поглощения веществ из окружающей среды и превращение их в специфические клеточные компоненты называют ассимиляцией, обратный процесс — разрушение специфических клеточных веществ и выделение их в окружающую среду — диссимиляцией.

Эндотермические процессы ассимиляции питательных веществ, идущие с поглощением энергии, часто называют анаболическими, а экзотермические процессы диссимиляций, связанные с выделением энергии, — катаболическими. Продукты, образующиеся в результате этих процессов, являются метаболитами, а все эти процессы в целом составляют обмен веществ — метаболизм. Синтез клеточных компонентов клетки обеспечивает конструктивный метаболизм, а энергию, необходимую для этих процессов, — энергетический метаболизм.

Внешне результат клеточной деятельности выражается увеличением размеров клетки и количества образующейся в результате клеточного деления биомассы. Наблюдаются изменения и в химическом составе среды: содержание одних компонентов среды в результате деятельности клеток уменьшается, других — увеличивается.

В сложных и разнообразных клеточных процессах обмена веществ участвуют многие биокатализаторы — ферменты, которые являются веществами белковой природы. Деятельность как отдельных клеточных структурных элементов, так и всей клетки в целом происходит лишь при участии ферментов. Следовательно, все биохимические процессы в клетке являются ферментативными. В соответствии с характером катализируемых реакций ферменты разделяются на шесть основных групп: оксидоредуктазы, трансферазы, гидролазы, лиазы, изомеразы и лигазы.



**Оксидоредуктазы.** Катализируют перенос атомов водорода или электронов. Участвуют в процессах дыхания и брожения. В результате их деятельности из органических веществ выделяется энергия. К этой группе принадлежат дегидрогеназы: 1) анаэробные дегидрогеназы, в активную группу которых входит НАД или НАДФ, например глицератдегидрогеназа, алкогольдегидрогеназа, лактатдегидрогеназа и 2) аэробные дегидрогеназы, в простетическую группу которых входит НАД или ФАД, например малатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназы,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа, система цитохронов, содержащая флавопротеиды, цитохромы, цитохромоксидазы. К этой же группе принадлежат также оксигеназы — ферменты, катализирующие включение атомов кислорода воздуха в молекулу субстрата.

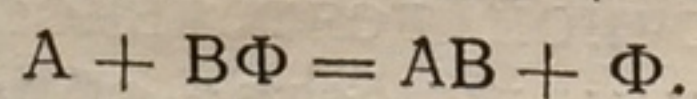
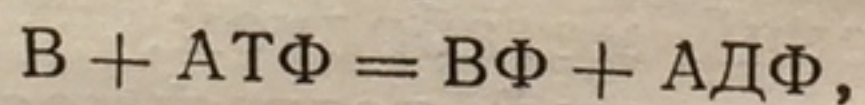
**Трансферазы.** Катализируют перенос групп атомов, например остаток фосфорной кислоты — фосфотрансфераза, аминок групп — аминотрансфераза и др.

**Гидролазы.** Катализируют гидролиз сложных органических соединений в присутствии воды, например эстеразы (липазы, пектинэстеразы), карбогидразы (лактаза, инвертаза, амилаза, целлюлаза), протеазы (пептидазы, протеиназы).

**Лиазы.** Катализируют негидролитическое отщепление различных групп от молекулы субстрата, например декарбоксилазы аминокислот, альдолазы, енолазы.

**Изомеразы.** Катализируют превращение органических веществ в их изомеры, например триозофосфатизомераза катализирует превращение 3-фосфоглицеральдегида в диоксиацетонфосфат.

**Лигаза (синтетаза).** Катализируют процесс соединения двух молекул при одновременном распаде молекулы АТФ по схеме



Так, пируваткарбоксилаза катализирует синтез щавелевоуксусной кислоты из пировиноградной кислоты и  $\text{CO}_2$ . К лигазам относятся также ферменты, катализирующие присоединение остатков аминокислот к т-РНК (транспортные рибонуклеиновые кислоты) в процессе биосинтеза белков и др.

Молекулы белков очень большие, поэтому и молекулярная масса ферментов обычно превышает миллион. Однако есть ферменты, молекулярная масса которых составляет 1000. Часть молекулы белка фермента, определяющая его специфичность, термостабильна. Под специфичностью надо понимать способность фермента воздействовать только на определенный субстрат, например сахараза гидролизует только сахарозу, уреазы — только мочевину, не воздействуя даже на ее производные. Фермент-



субстратную специфичность обычно сравнивают по рекомендации Э. Фишера с соответствием ключа и замка. Свою специфичность ферменты реализуют при помощи каталитического центра. Обычно этот центр образует участок аминокислотной цепи в молекуле ферментного белка строго определенной аминокислотной последовательности и пространственной конфигурации.

В белковой части фермента может находиться и аллостерический центр, имеющий большое значение в регуляции ферментной активности. После присоединения к этому центру соответствующих веществ — эффекторов активность фермента изменяется. Конечные продукты ферментативных реакций обычно являются негативными эффекторами — присоединение их к аллостерическому центру фермента уменьшает его активность. Вещества, присоединение которых к аллостерическому центру молекулы фермента вызывают увеличение активности, называют позитивными эффекторами.

Часть ферментов представляет собой сложные белки — протеиды, содержащие кроме белковой части — апофермента, еще и небелковую (простетическую) часть — кофермент.

Во многих случаях коферментами являются витамины. Так, в состав пируватдекарбоксилазы, катализирующей образование уксусной кислоты из пировиноградной кислоты, входит тиамин (витамин  $B_1$ ). В состав дегидрогеназ часто входит рибофлавин (витамин  $B_2$ ), в состав аминотрансфераз — пиридоксальфосфат. Функцию простетических групп в молекуле ферментов иногда могут выполнять комплексы, содержащие ионы металлов. Считают, что металлы при соединении фермента с субстратом сближают последний с каталитическим центром фермента, обеспечивая начало реакции, или же непосредственно участвуют в процессе переноса электронов. Известно по меньшей мере 15 ионов металлов, в том числе микроэлементов, активирующих ферменты.

Коферменты определяют природу катализируемой реакции.

По выполняемым функциям коферменты можно разделить на три группы:

1) коферменты, переносящие ионы водорода или электроны. Они связаны с окислительно-восстановительными ферментами — оксидоредуктазами;

2) коферменты, участвующие в переносе групп атомов. Они связаны с трансферазами;

3) коферменты, катализирующие реакции синтеза, распада и изомеризацию углеродных связей. Эта группа связана с действием лиаз, изомераз и лигаз.

В первую группу входят коферменты, содержащие никотинамид. Они, по существу, являются нуклеотидами — производны-



ми пиридина. К этой группе принадлежат никотинамидадениндинуклеотид (НАД) и никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ). Эти коферменты входят в состав дегидрогеназ и участвуют в превращении спиртов, оксикислот и некоторых аминокислот в соответствующие альдегиды, кетоны и кетокислоты.

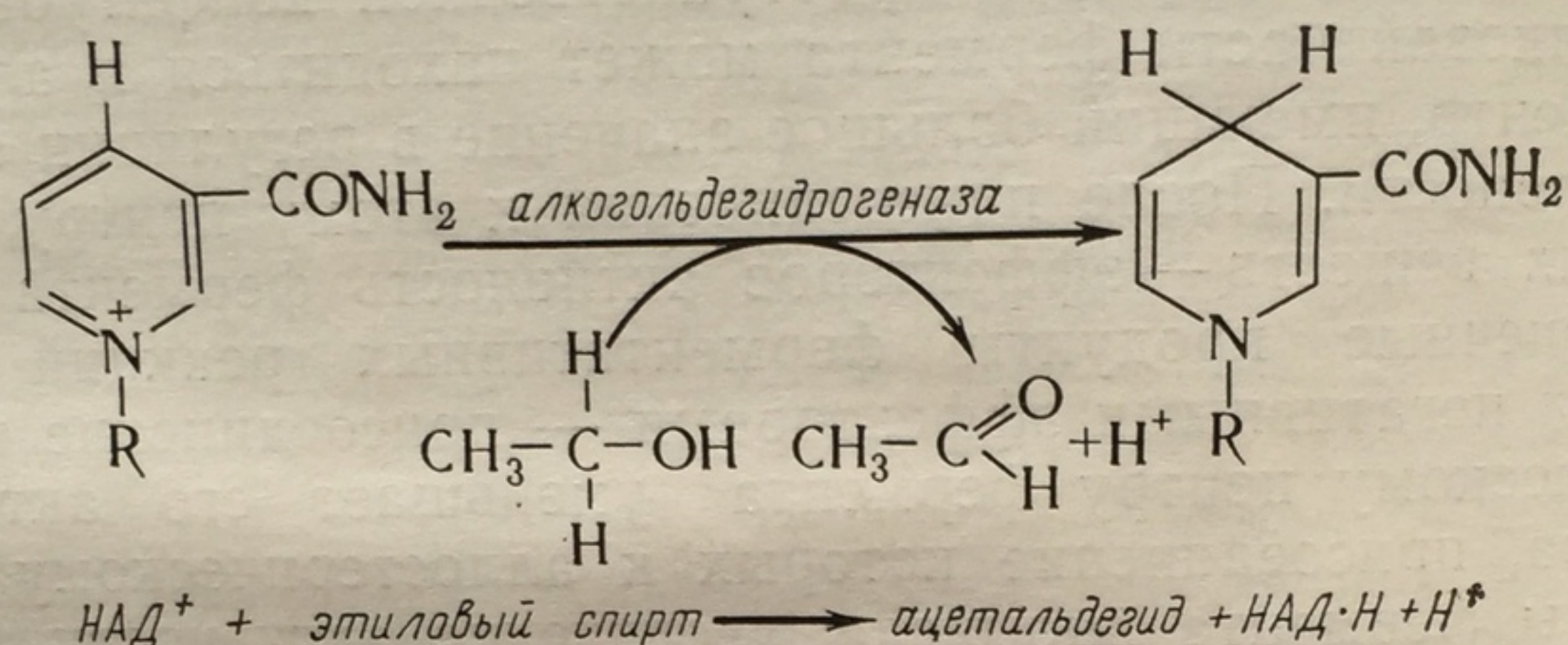


Рис. 9. Схема окисления этилового спирта

В состав обоих коферментов (НАД и НАДФ) входит никотинамид, обеспечивающий перенос пары электронов или протонов от субстрата, например окисление этилового спирта в присутствии алкогольдегидрогеназы (рис. 9). К этой же группе относятся коферменты, содержащие флавины — флавинмононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД), которые участвуют в переносе электронов и водорода по дыхательной цепи.

Во вторую группу коферментов входят:

а) аденозинтрифосфат (АТФ), очень богатое энергией соединение, синтезируемое в митохондриях (рис. 10). При гидролитическом разрыве каждой макроэргической, фосфоангидридной связи молекулы АТФ выделяется около 30 кДж/моль. При превращении АТФ в АДФ выделяющаяся энергия переходит в фосфорилированные соединения или же выделяется в виде тепла;

б) фосфаты углеводов (глюкозы, маннозы);

в) кофермент ацилирования (КоА), в состав которого входит пантотеновая кислота. Этот фермент имеет большое значение в клеточных реакциях, связанных с циклом Кребса, глиоксальным циклом, окислением и синтезом жирных кислот, стероидов, каротиноидов, изопреноидов, жиров и фосфатидов.

Во всех этих реакциях КоА действует как акцептор и переносчик остатков кислот;

г) тетрагидрофолиевая кислота, действующая как переносчик одноуглеродных остатков;

д) пиридоксаль-5-фосфат, имеющий большое значение в обмене азотсодержащих веществ. Он участвует в переаминирова-

нии аминокислот и др.  
В третью группу коферментов относятся  
а) тиаминпирофосфат (ТПФ), участвующий в реакциях окисления и кетокислот  
кислот и кетосахаров  
карбоксилазы. Тиамин

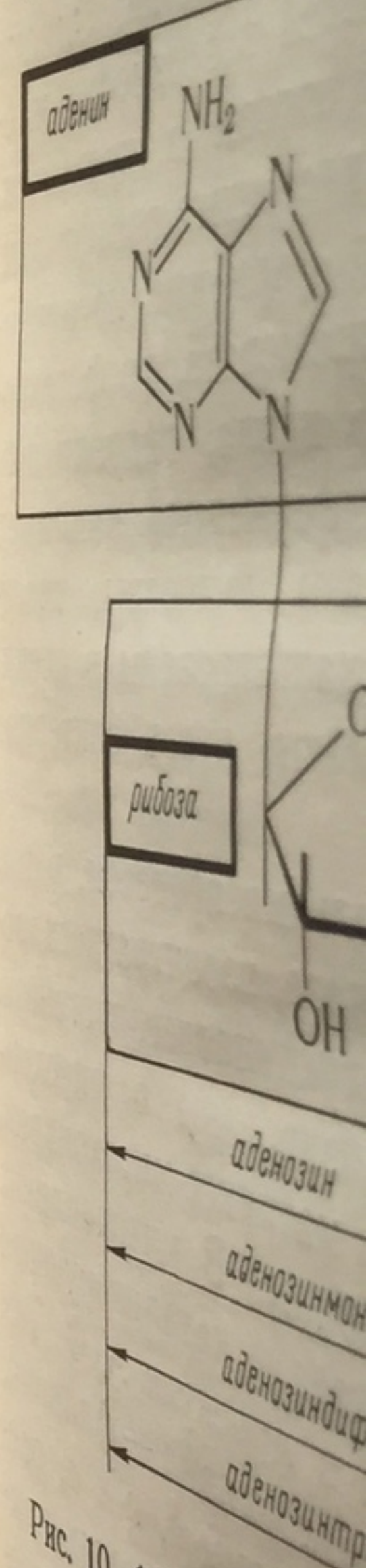


Рис. 10. АТФ — источник энергии

окисления пируват  
пируват + CO<sub>2</sub> + А  
в) кобаламины (цианкобаламин). В  
ианида находятся о  
мент в отличие от ви



нии amino- и кетокислот, в декарбоксилировании и рацемизации аминокислот и др.

В третью группу коферментов входят:

а) тиаминпирофосфат, участвующий в превращении  $\alpha$ -кетокислот и кетосахаров. Этот фермент входит в состав пируватдекарбоксилазы. Тиаминпирофосфат участвует не только в декар-

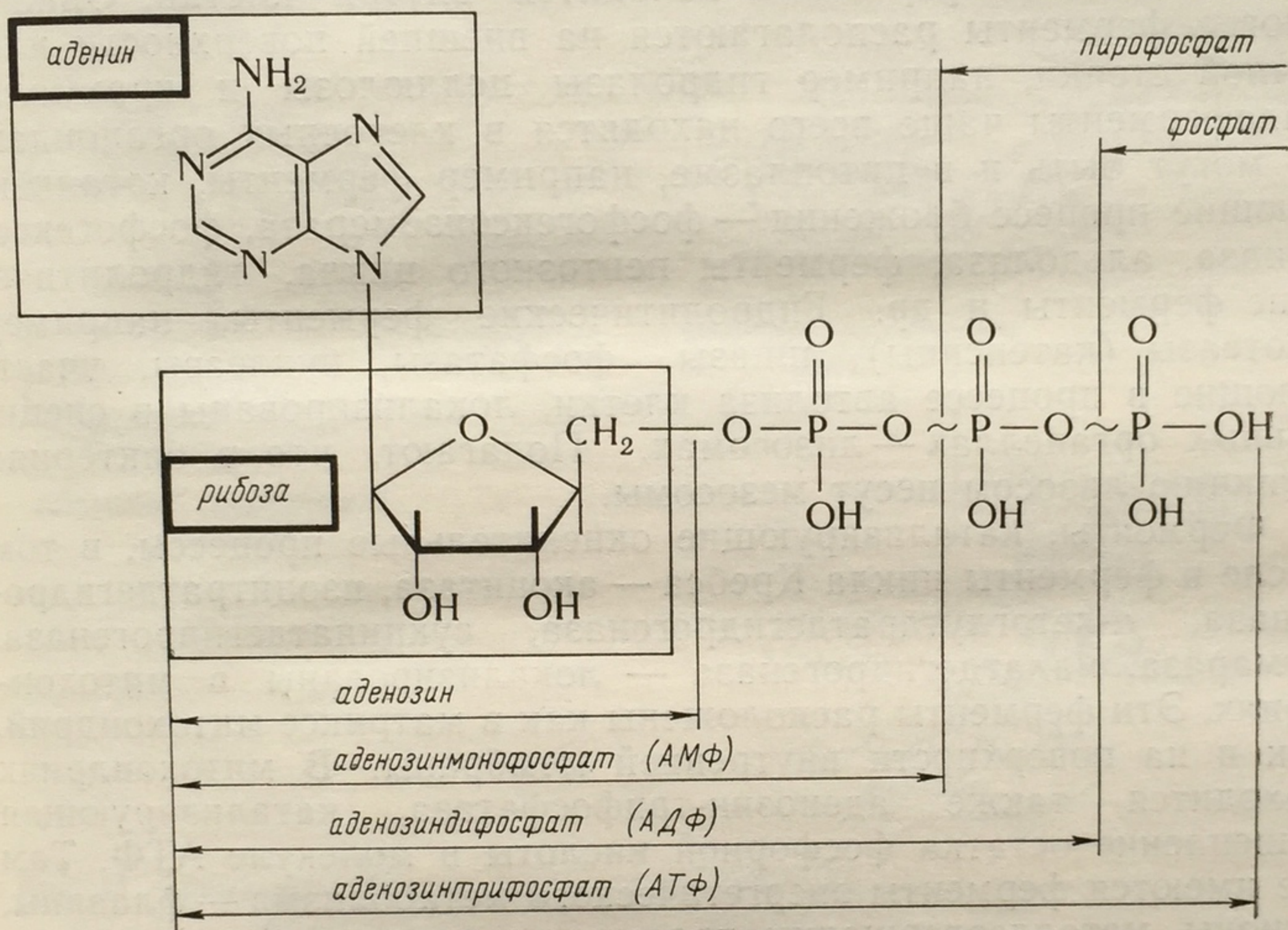
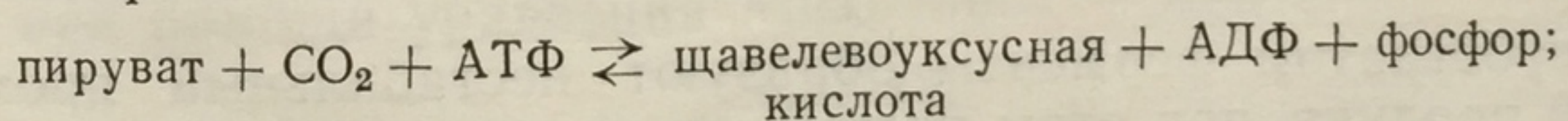


Рис. 10. АТФ — источник клеточной энергии

боксилировании пирувата, но и в окислительном декарбоксилировании  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, в образовании и разрушении  $\alpha$ -оксикислот и дикетонов;

б) биотин, входящий в качестве кофермента в ферменты, катализирующие реакции обратимого карбоксилирования; в этих реакциях биотин действует как переносчик  $\text{CO}_2$ . Одновременно здесь участвует АТФ, которая переходит в АДФ, например в случае образования щавелевоуксусной кислоты из пирувата:



в) кобамидные коферменты — производные витамина  $\text{B}_{12}$  (цианкобаламин). В молекуле этого витамина вместо остатка цианида находится один остаток аденозина. Кроме того, кофермент в отличие от витамина  $\text{B}_{12}$  содержит атом кобальта в вос-



становленном состоянии. Этот кофермент, входя в состав ферментов изомеризации, катализирует синтез метионина, тимина, белков, образование дезоксирибозы, восстановление дисульфидных связей. В качестве примера можно привести превращение L-глутаминовой кислоты в  $\beta$ -метил-L-аспарагиновую кислоту при участии метиласпартатмутаза.

Большинство ферментов находится внутри клетки. Однако многие ферменты располагаются на внешней поверхности клеточной стенки, например гидролазы целлюлозы и крахмала. Эндоферменты чаще всего находятся в клеточных органоидах, но могут быть и в цитоплазме, например ферменты, катализирующие процесс брожения, — фосфогексоизомераза, фосфогексокиназа, альдолаза, ферменты пентозного цикла, гидролитические ферменты и др. Гидролитические ферменты, например протеазы (катепсины), липазы, фосфатазы, нуклеазы, участвующие в процессе автолиза клетки, локализованы в специальных органеллах — лизосомах. Полагают, что в бактериях функцию лизосом несут мезосомы.

Ферменты, катализирующие окислительные процессы, в том числе и ферменты цикла Кребса — аконитаза, изоцитратдегидрогеназа,  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, фумараза, малатдегидрогеназа — локализованы в митохондриях. Эти ферменты расположены как в матриксе митохондрий, так и на поверхности внутренней мембраны. В митохондриях находится также аденозин-трифосфатаза, катализирующая отщепление остатка фосфорной кислоты в молекуле АТФ. Там же имеются ферменты энергетического метаболизма — флавины, хиноны, металлсодержащие протеиды, цитохромы *b*, *c* и *a*, расположенные на внутренней поверхности митохондриальных мембран в строгой последовательности и образующие так называемую дыхательную цепь.

В рибосомах находятся ферменты, участвующие в синтезе белков, а также кислые фосфатазы, отщепляющие фосфорную кислоту от ее эфиров.

В цитоплазматической мембране имеются пермеазы, катализирующие транспорт веществ, и другие ферменты.

### КИНЕТИКА ФЕРМЕНТАТИВНЫХ РЕАКЦИЙ

С субстратом ферменты образуют нестабильный промежуточный продукт, при этом получается фермент-субстратный комплекс, который затем распадается на свободный фермент и продукт реакции (рис. 11).

Соединение фермента с субстратом идет в каталитическом центре. Оно может происходить за счет ковалентных связей, при

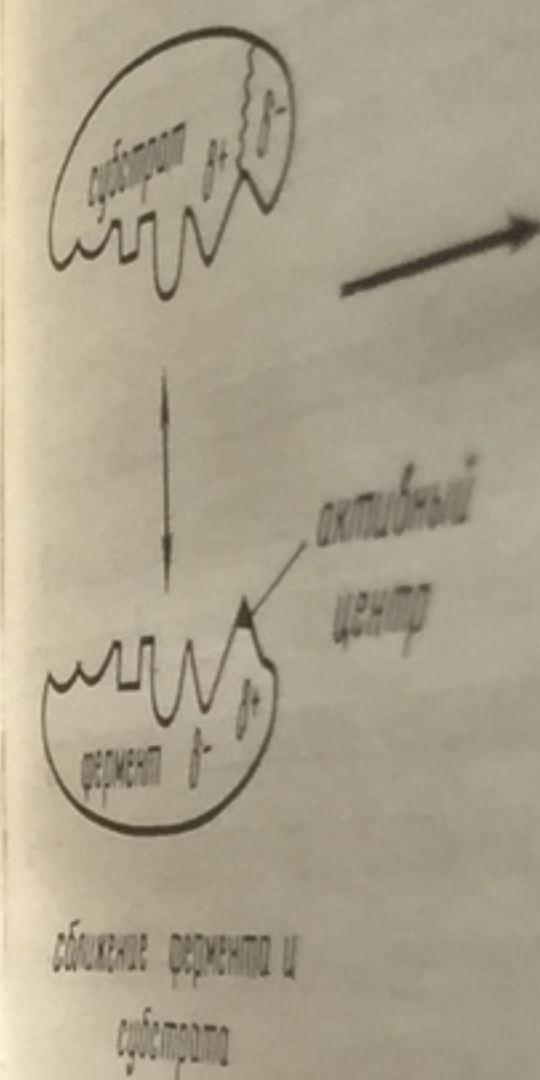
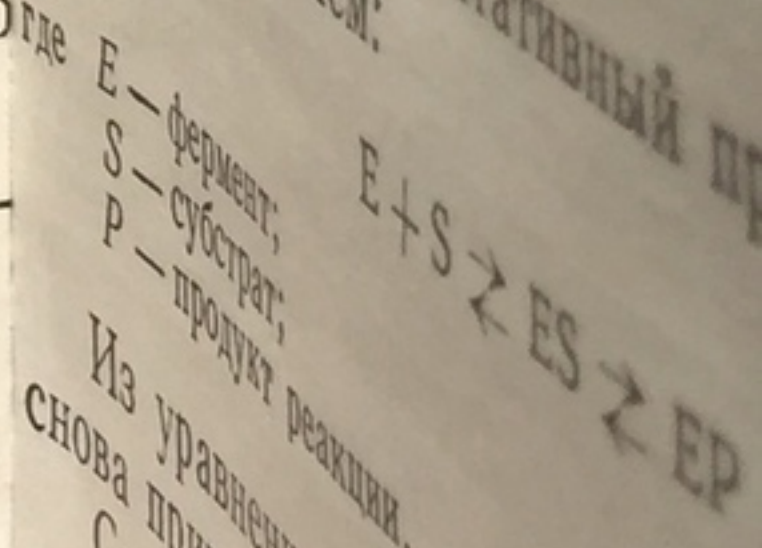


Рис. 11. Схема воздействия фермента на субстрат. В общем виде ферментативный процесс описывается уравнением:



Из уравнения видно, что фермент участвует в реакции, но не расходуется. Скорость ферментативной реакции можно описать уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$v = \frac{v_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

где  $v_{\max}$  — максимальная скорость реакции,  $[S]$  — концентрация субстрата,  $K_m$  — константа Михаэлиса.



участии электронов, за счет водородных связей или более слабых взаимодействий, например сил Ван-дер-Ваальса. Все это означает, что фермент и субстрат в районе каталитического центра должны сблизиться до расстояния 1,5—2 нм. В этих условиях внутренние связи в молекуле субстрата ослабляются и происходит изменение этого соединения.

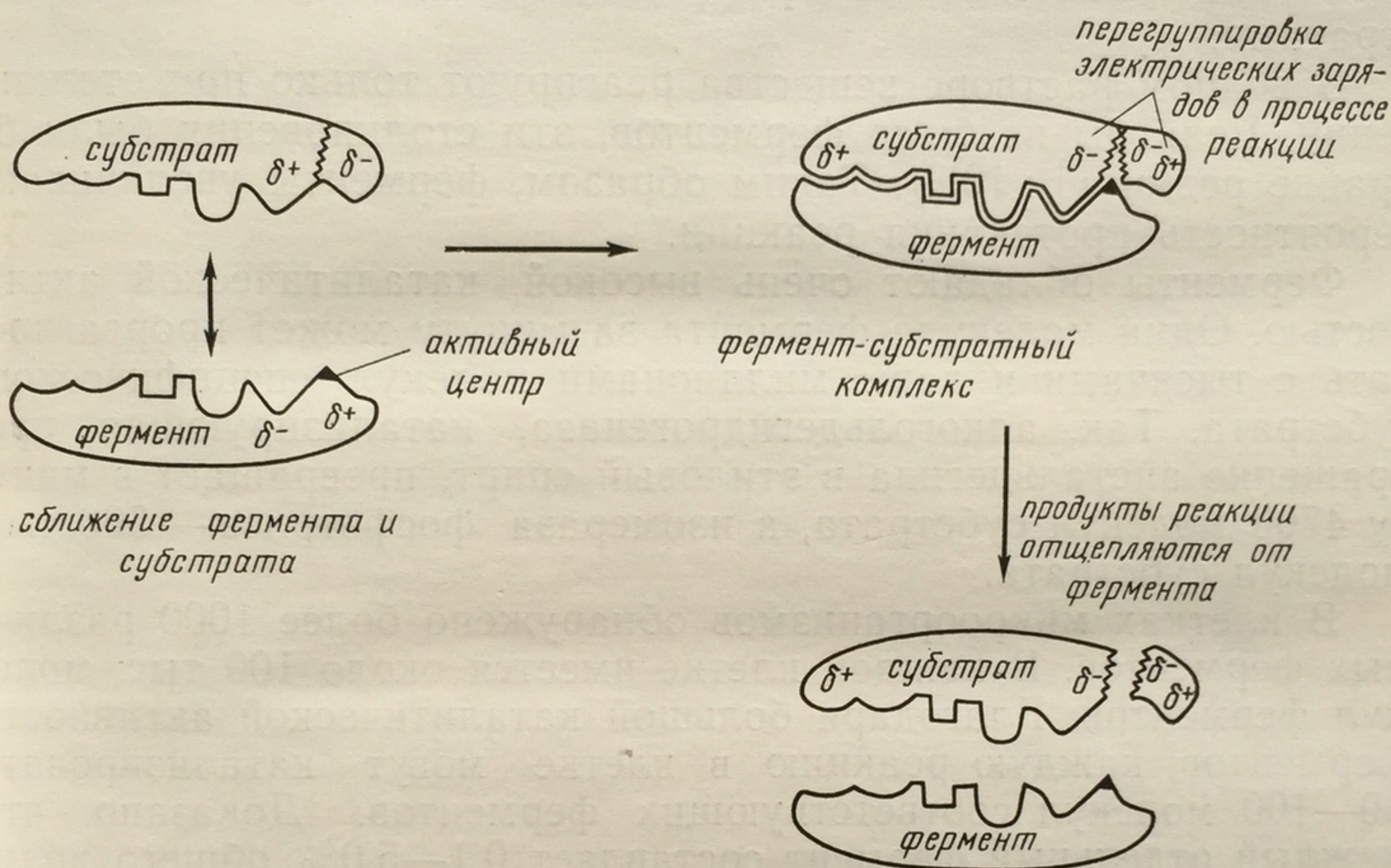
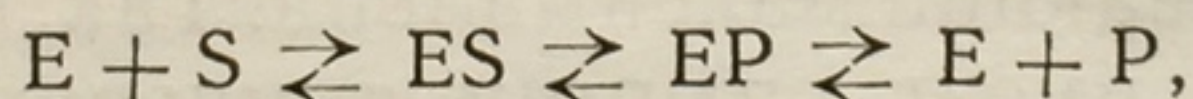


Рис. 11. Схема воздействия фермента на субстрат

В общем виде ферментативный процесс можно отразить следующим уравнением:



где  $E$  — фермент;  
 $S$  — субстрат;  
 $P$  — продукт реакции.

Из уравнения видно, что фермент освобождается и может снова принять участие в реакции.

Скорость ферментативной реакции  $v$  можно охарактеризовать при помощи уравнения Михаэлиса — Ментена.

$$v = \frac{v_{\text{макс}} [S]}{K_M + [S]},$$

где  $v_{\text{макс}}$  — максимальная скорость реакции;  
 $[S]$  — концентрация субстрата;  
 $K_M$  — константа Михаэлиса.



Численно константа  $K_m$  равна концентрации субстрата, при которой скорость реакции составляет половину максимальной.  $K_m$  имеет размерность Моль.

Встречаются реакции и других типов, например обратимые с одним субстратом. По такому типу идет ферментативное превращение фумаровой кислоты в присутствии фермента фумаразы. Могут происходить необратимые реакции с несколькими субстратами.

В водном растворе вещества реагируют только при столкновении. Если бы не было ферментов, эти столкновения были бы крайне редки ( $1 : 10^{12}$ ). Таким образом, ферменты увеличивают вероятность протекания реакции.

Ферменты обладают очень высокой каталитической активностью. Одна молекула фермента за минуту может прореагировать с тысячами и даже миллионами молекул специфического субстрата. Так, алкогольдегидрогеназа, катализирующая превращение ацетальдегида в этиловый спирт, превращает в минуту 4700 молекул субстрата, а изомеразы фосфотриоз — 500 тыс. молекул субстрата.

В клетках микроорганизмов обнаружено более 1000 различных ферментов. В каждой клетке имеется около 100 тыс. молекул ферментов. Благодаря большой каталитической активности ферментов, каждую реакцию в клетке могут катализировать 50—100 молекул соответствующих ферментов. Доказано, что каждый отдельный фермент составляет 0,1—5,0% общего количества белка в клетке. Из этого следует, что основная масса клеточных белков состоит из ферментов.

Каталитическая активность ферментов зависит от температуры, pH среды и присутствия различных веществ. Для действия каждого фермента характерна оптимальная температура, при которой скорость реакции максимальна. Так,  $\alpha$ -амилаза культуры *Aspergillus oryzae* имеет оптимум температуры 50—55°C. При повышении температуры от 20 до 60°C скорость реакции растет; дальнейшее повышение температуры вызывает денатурацию белка и вместе с тем падение скорости реакции. Влияние температуры на активность ферментов показано на рис. 12. Оптимум температуры большинства используемых в биотехнологии ферментов микроорганизмов лежит в пределах 30—40°C.

Оптимум действия одних ферментов, например пепсина, наблюдается в кислой среде (pH 2,0), других — в щелочной, а у большинства ферментов — в нейтральной среде. Изменение активности лактатдегидрогеназы культуры *Vac. subtilis* в зависимости от pH среды показано на рис. 13.

Присутствие некоторых веществ может повышать активность действия ферментов (активаторы), а также снижать ее (инги-

биторы). Активаторами являются глутатин, восстановительные SH-группы, которые входят в состав ферментов, могут быть металлов, которые образуют комплексы (растворов), или специфически реагируя с определенными группами, ингибирует действие фермента.

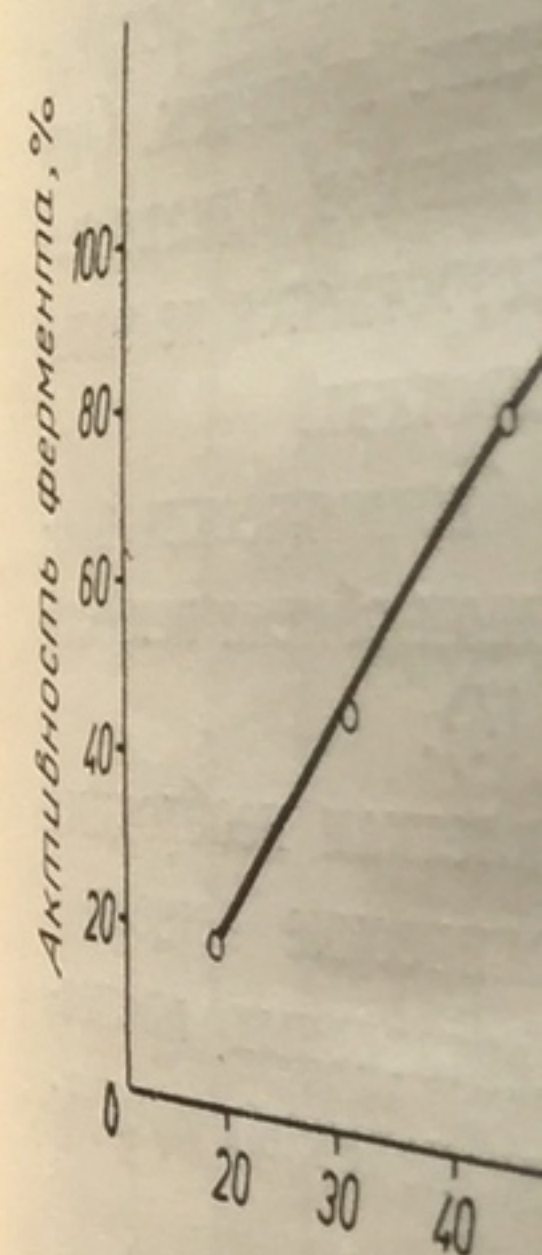
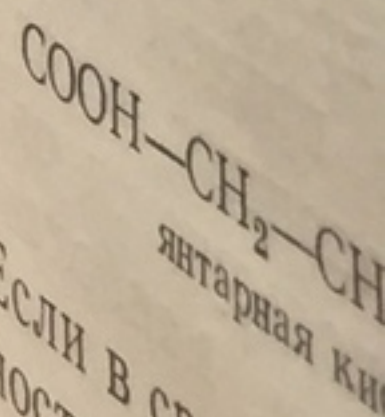


Рис. 12. Влияние температуры на активность гидрогеназы

Некоторые вещества являются субстратами. Обычно действия фермента вызываются веществами, называемыми субстратами. Например, натрийдегидрогеназа катализирует реакцию окисления фумарата.



Если в среде присутствует фермент, то очевидно, что он конкурирует с субстратом. Он конкурирует с субстратом за активные группы. Он конкурирует с субстратом за активные группы. Он конкурирует с субстратом за активные группы.



биторы). Активаторами многих ферментов являются цистеин и глутатион, восстанавливающие дисульфидную связь, образуя SH-группы, которые часто определяют ферментативную активность, входя в состав каталитических центров. Ингибиторы ферментов могут быть неспецифическими (например, соли тяжелых металлов, которые при связывании с белками осаждают их из растворов), или специфическими (например, синильная кислота, реагируя с определенными химическими группами ферментов, ингибирует действие железосодержащих дыхательных ферментов).

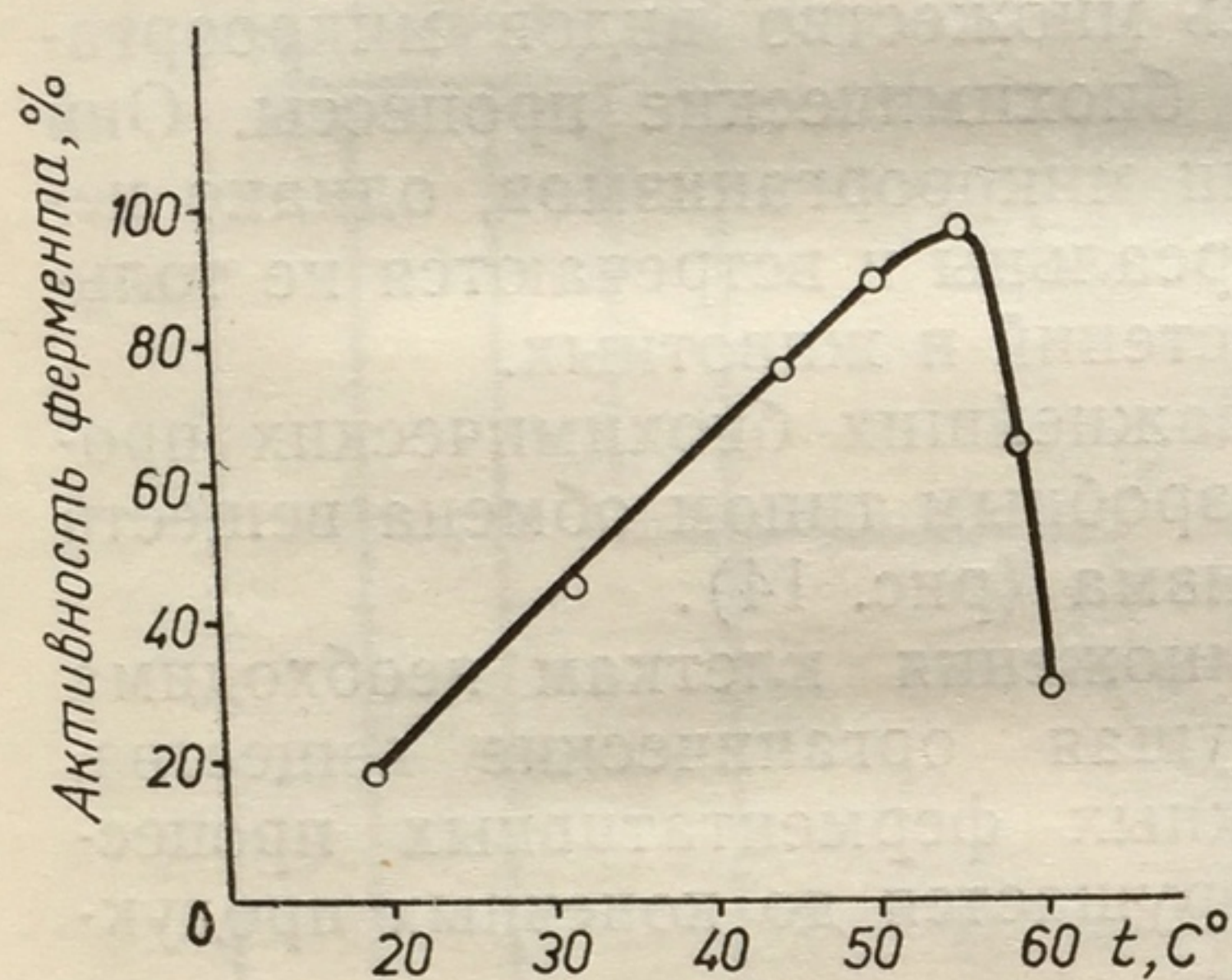


Рис. 12. Влияние температуры на активность гидрогеназы

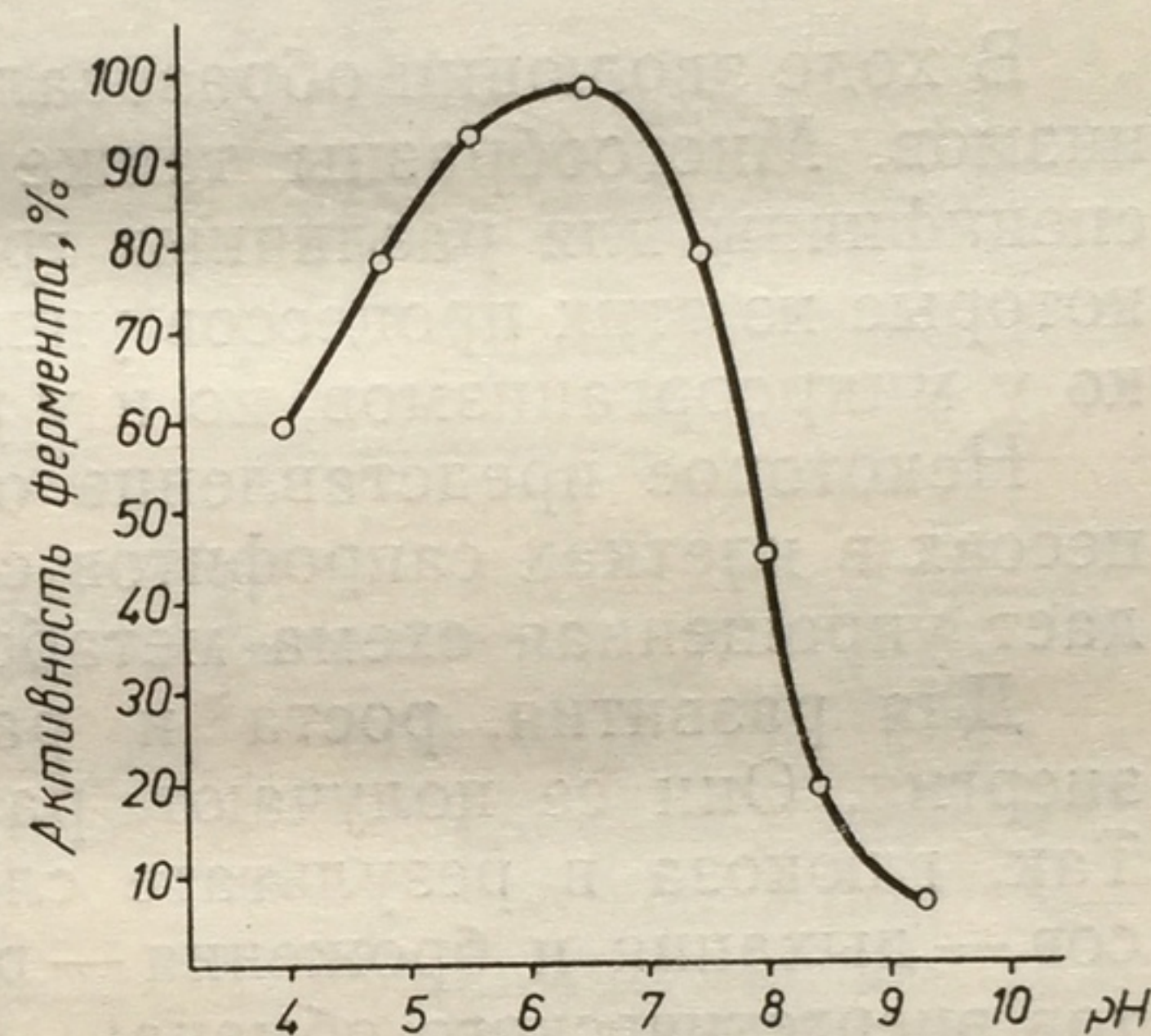
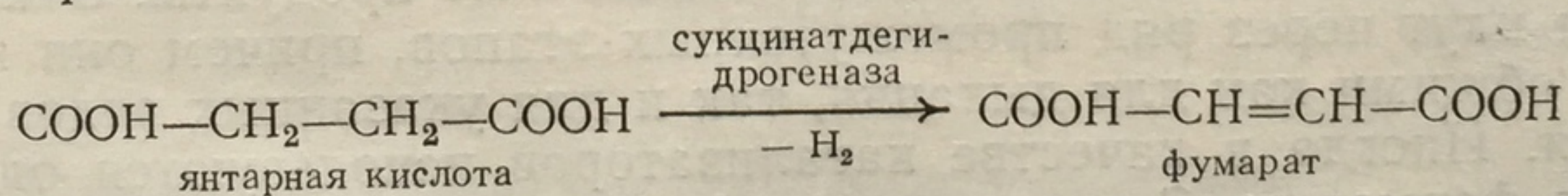


Рис. 13. Влияние pH на активность лактатдегидрогеназы

Некоторые вещества в присутствии ферментов конкурируют с субстратом. Обычно это наблюдается при попадании в сферу действия фермента структурных аналогов субстрата. Такие вещества называют субстратными антиметаболитами. Так, сукцинатдегидрогеназа катализирует превращение янтарной кислоты в фумарат.



Если в среде появляется маланат ( $\text{COOH}-\text{CH}_2-\text{COOH}$ ), активность фермента заметно снижается. Маланат, таким образом, является конкурентным ингибитором сукцинатдегидрогеназы. Он, очевидно, связывается с активным центром фермента вместо янтарной кислоты. Антиметаболитом является также сульфаниламид. Он конкурирует с парааминобензойной кислотой.



Синтез ферментов, как и всех других белков, идет на рибосомах из свободных аминокислот. Концентрация различных ферментов в клетке не является постоянной величиной. Их количество можно тысячекратно увеличить путем индукции, которую вызывают добавлением в среду субстрата. Внесение мальтозы в среду выращивания хлебопекарных дрожжей вызывает, например, увеличение содержания фермента мальтазы в клетках дрожжей.

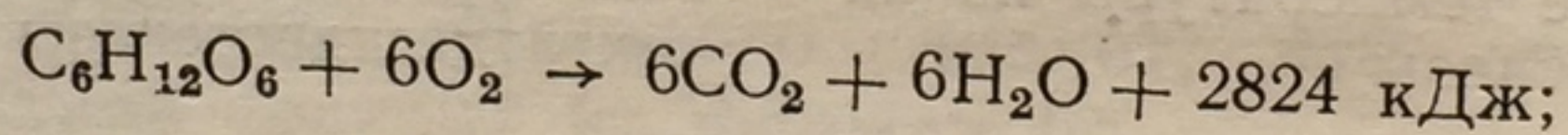
### ВАЖНЕЙШИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ

В ходе эволюции образовалось множество видов микроорганизмов. Многообразны также и биохимические процессы. Они специфичны для различных групп микроорганизмов, однако некоторые из этих процессов универсальны и встречаются не только у микроорганизмов, но и у растений и животных.

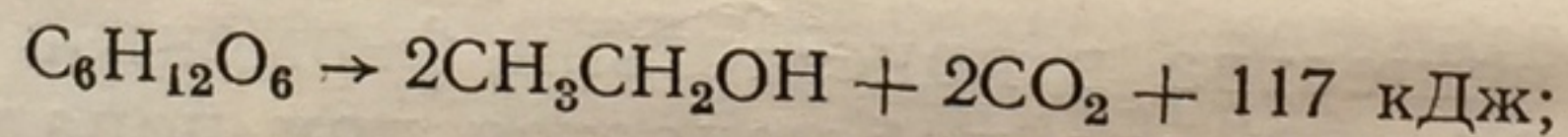
Некоторое представление о важнейших биохимических процессах в клетках сапрофитов с аэробным типом обмена веществ дает упрощенная схема метаболизма (рис. 14).

Для развития, роста и размножения клеткам необходима энергия. Они ее получают, разрушая органические вещества. Так, глюкоза в результате сложных ферментативных процессов — дыхания и брожения — разрушается до конечных продуктов энергетического обмена:

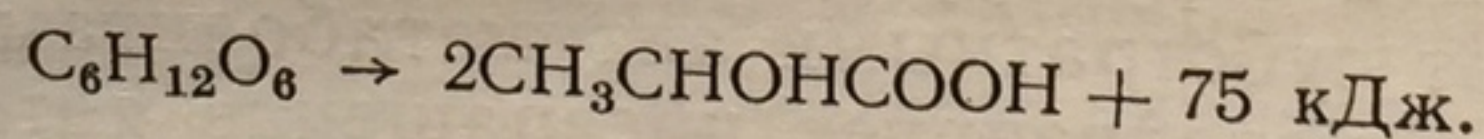
- 1) дыхание (в присутствии  $O_2$ )



- 2) спиртовое брожение



- 3) молочнокислое брожение



В уравнениях показаны только конечные продукты. Эти процессы идут через ряд промежуточных этапов, причем они являются общими как для дыхания, так и для указанных видов брожения. Иногда в качестве катализаторов используются одни и те же ферменты. С энергетической точки зрения, наиболее эффективным является процесс дыхания, в котором выделяется наибольшее количество энергии. В клетке энергия используется в виде химической энергии макроэргических связей АТФ.

Анаэробный ферментативный гидролиз глюкозы до пирувиноградной кислоты (пируват) носит название гликолиза. Это один из универсальных ферментативных процессов, так как с не-

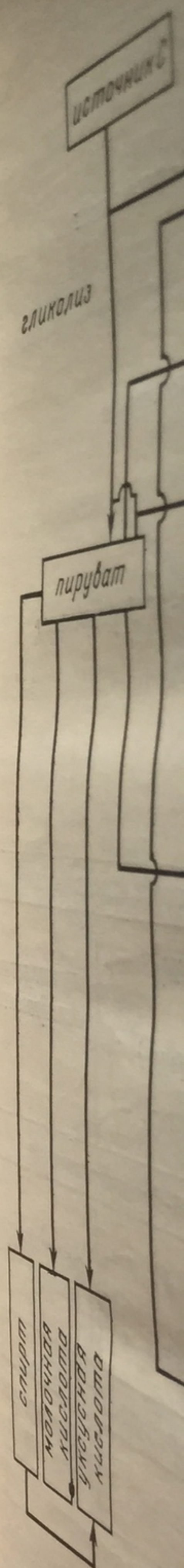


Рис. 14. Схема метаболизма



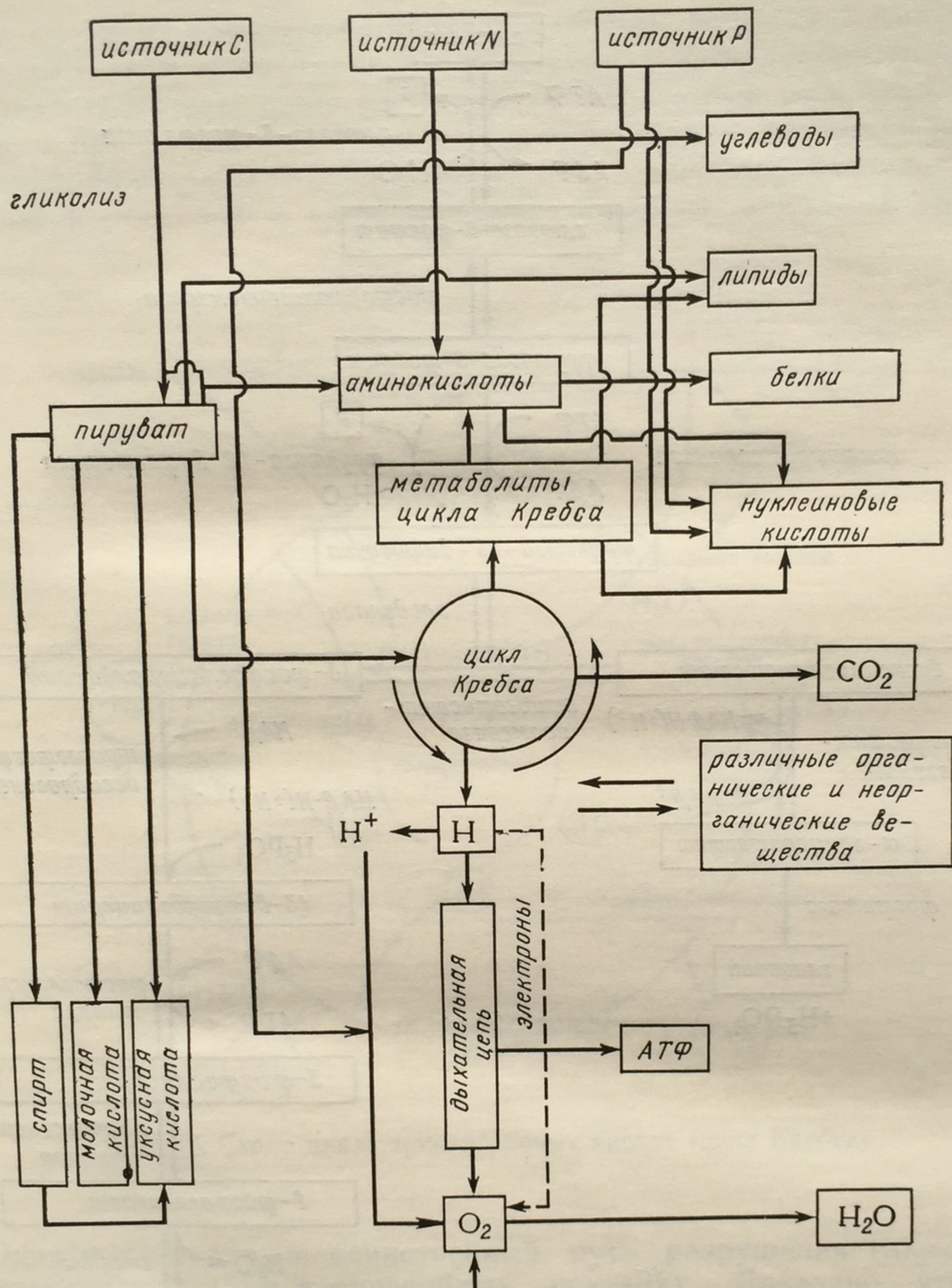


Рис. 14. Схема метаболизма сапрофитных микроорганизмов

го начинается дыхание, спиртовое и молочнокислое брожения, а также другие биохимические процессы.

Последовательность реакций, ферменты, катализирующие их, и промежуточные продукты гликолиза показаны на рис. 15. Образующийся в процессе гликолиза пируват является очень



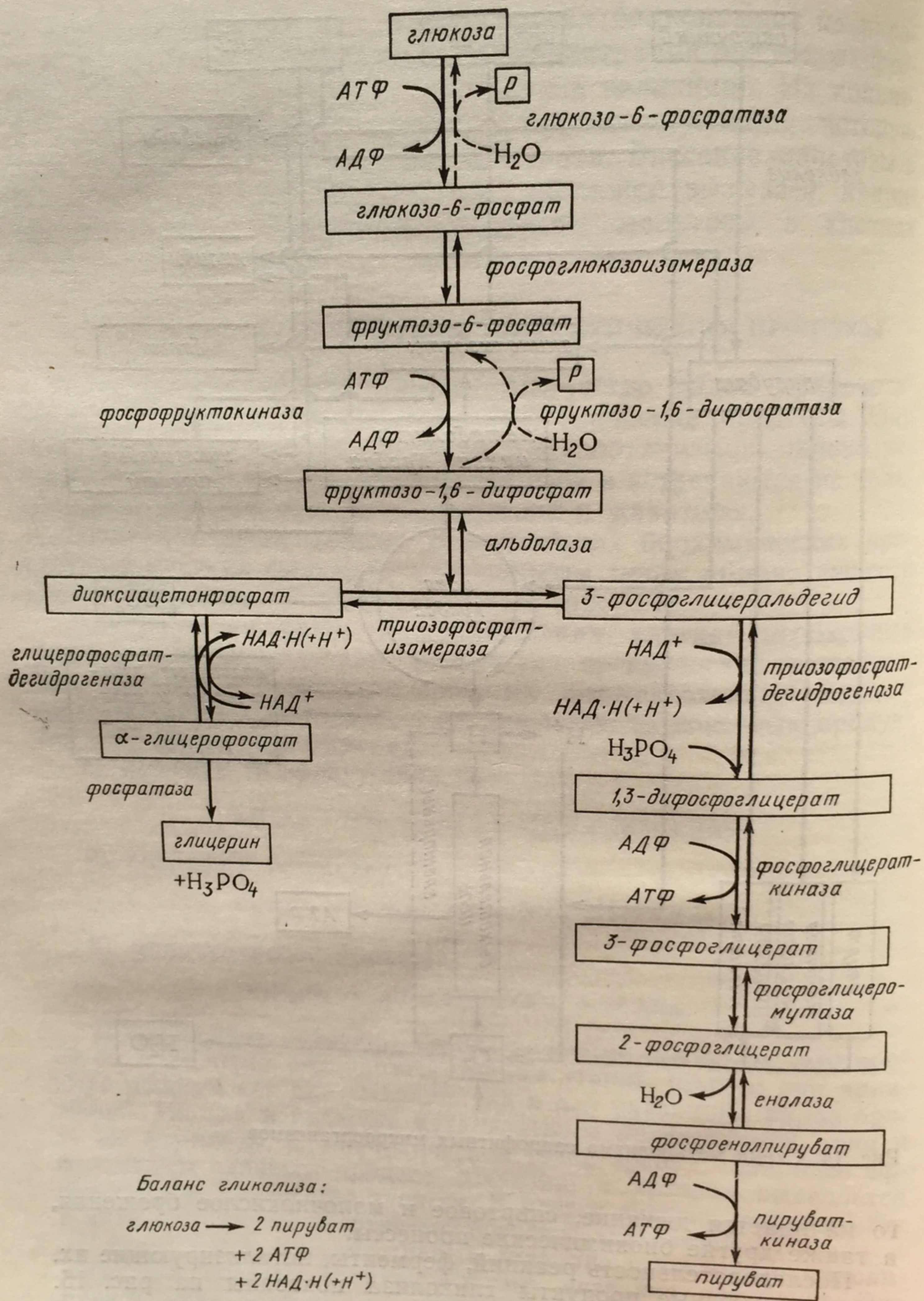


Рис. 15. Схема гликолиза

важным промежуточным продуктом в ганазмах. При молотакта лактатдегидрогеназы, а при спиртоватдекарбоксилазы и кольдегидрогеназы

триоза

яблочная кислота

$+ \text{H}_2\text{O}$

фумаровая кислота

янтарная кислота

$+ \text{H}_2\text{O}$

Рис. 16. Схема

Однако гликолиз микроорганизмов в клетках дрожжей для аэробных условий цикла трикарбоновых кислот. Освоение стьющим ферментами



важным промежуточным продуктом обмена веществ в микроорганизмах. При молочнокислом брожении в присутствии фермента лактатдегидрогеназы из пирувата образуется молочная кислота, а при спиртовом брожении в присутствии фермента пируватдекарбоксилазы — ацетальдегид, из которого фермент алкогольдегидрогеназа в свою очередь образует этиловый спирт.

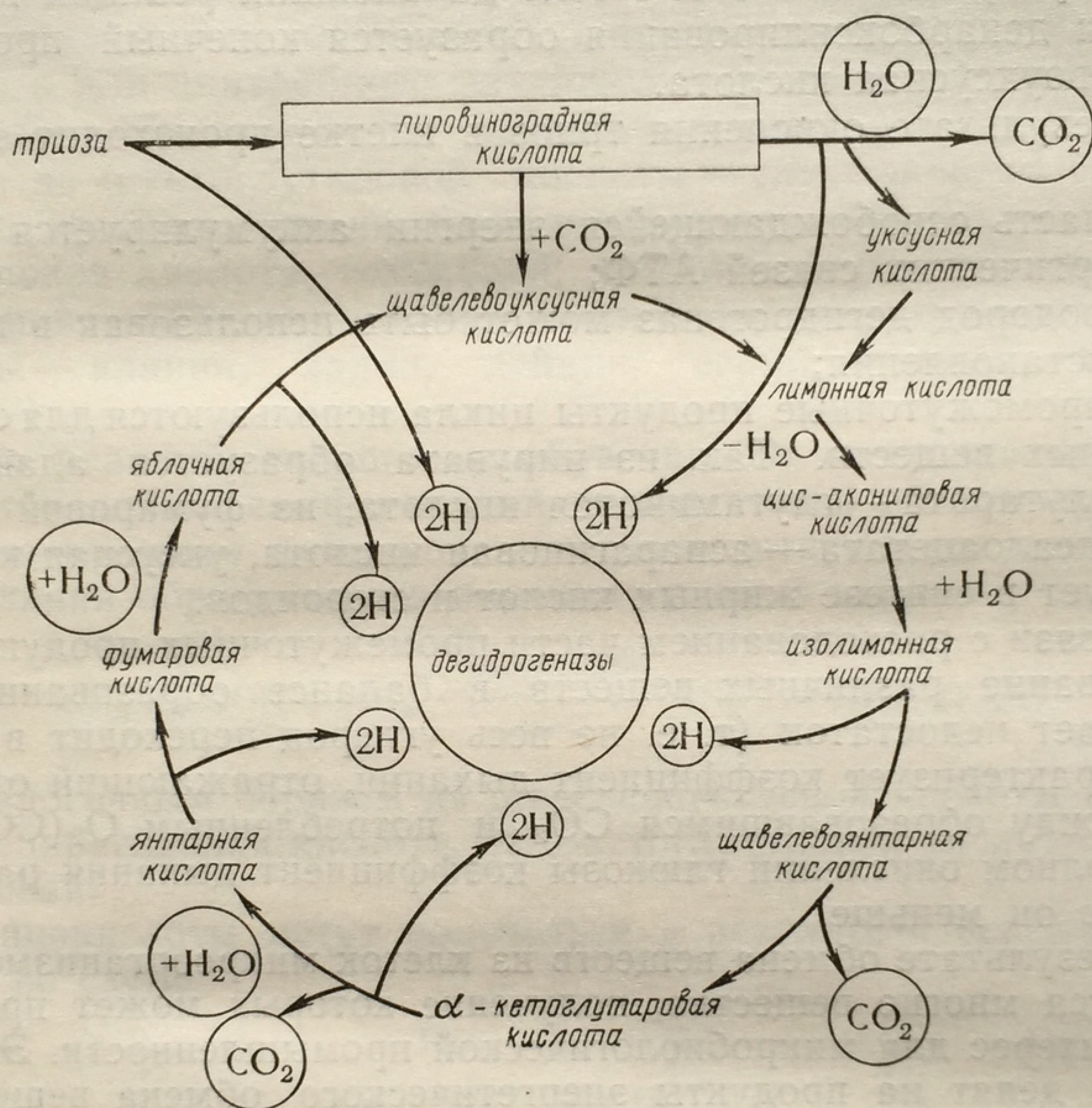


Рис. 16. Схема цикла трикарбоновых кислот (цикл Кребса)

Однако гликолиз не единственный путь разрушения глюкозы микроорганизмами в анаэробных условиях. Доказано, что в клетках дрожжей и других микроорганизмов глюкоза может разрушаться по гексозомонофосфатному, или пентозному, пути.

В аэробных условиях пируват является исходным веществом для цикла трикарбоновых кислот, где процесс окисления идет до  $\text{CO}_2$  и воды (рис. 16). Вначале в результате окислительного декарбоксилирования пировиноградная кислота превращается в уксусную. Освободившийся атом водорода связывается соответствующим ферментом дегидрогеназой. Этот атом, как и все дру-



гие образовавшиеся в цикле Кребса атомы водорода, в дыхательной цепи соединяется с  $O_2$ , образуя воду. Уксусная кислота через КоА соединяется с щавелевоуксусной кислотой (оксалоацетатом), образуя лимонную кислоту, которая через *цис*-ацитоновую и изолимонную кислоты превращается в щавелевоянтарную кислоту, при декарбоксилировании которой образуется  $\alpha$ -кетоглутаровая кислота. После дальнейших реакций дегидратаций и декарбоксилирования образуется конечный продукт — щавелевоуксусная кислота.

В результате окисления триоз в клетке происходит следующее:

1) часть освобождающейся энергии аккумулируется в виде макроэргических связей АТФ;

2) водород дегидрогеназ может быть использован в процессах восстановления;

3) промежуточные продукты цикла используются для синтеза клеточных веществ. Так, из пирувата образуется аланин, из  $\alpha$ -кетоглутарата — глутаминовая кислота, из фумаровой кислоты и оксалоацетата — аспарагиновая кислота, уксусная кислота участвует в синтезе жирных кислот и стероидов.

В связи с расхождением части промежуточных продуктов на образование различных веществ в балансе образования  $CO_2$  возникает недостаток (т. е. не весь углерод переходит в  $CO_2$ ). Это характеризует коэффициент дыхания, отражающий отношение между образовавшимся  $CO_2$  и потребленным  $O_2$  ( $CO_2/O_2$ ). При полном окислении глюкозы коэффициент дыхания равен 1. Обычно он меньше.

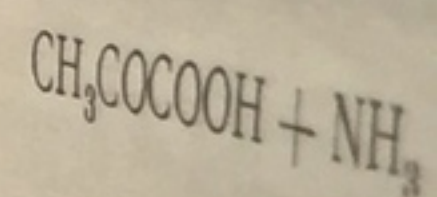
В результате обмена веществ из клеток микроорганизмов выделяются многие вещества, получение которых может представлять интерес для микробиологической промышленности. Эти вещества делят на продукты энергетического обмена веществ и продукты биосинтеза. К первым относятся уксусная и молочная кислоты, этиловый спирт и др. Микробиологические процессы, ведущие к образованию этих веществ, называют брожением. В результате биосинтеза образуются ферменты, токсины, антибиотики, аминокислоты, витамины, пуриновые и пиримидиновые основания и другие продукты конструктивного обмена веществ, диссимилиации или автолиза.

#### БИОСИНТЕЗ БЕЛКОВ И НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Биосинтез — один из основных вопросов молекулярной биологии. Молекула белка состоит из взаимосвязанных цепей аминокислот, молекулы нуклеиновых кислот — из цепей нуклеотидов. Нуклеотиды, состоящие из азотистого основания, пентозы

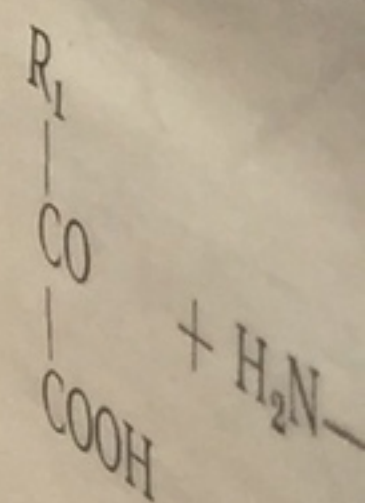
и фосфорной кислоты, синтезируются в клетке. Белки синтезируются из аминокислот, образующихся в клетке. Аминокислоты образуются из  $\alpha$ -кетоглутарата, образующегося в цикле Кребса. Из  $\alpha$ -кетоглутарата образуются аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота, лимонная кислота, валин (рис. 17).

Цель реакций, ведущих к образованию аминокислот, заключается в том, чтобы восстановить аминокислоты. Так, аланин образуется из пирувата.



Аналогичным образом образуются аспарагиновая кислота, глутаминовая.

Аминокислоты могут быть синтезированы по схеме



Эти реакции переаминоирования катализируются ферментами.

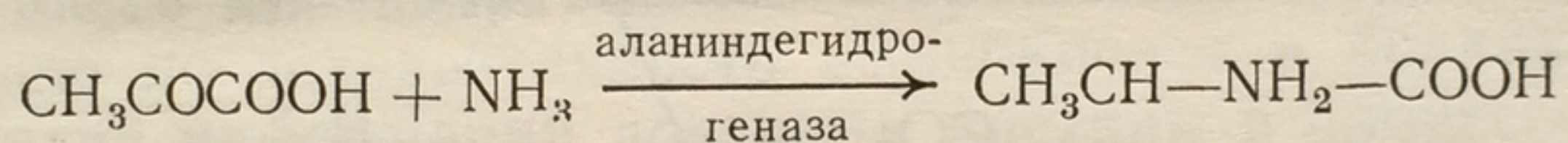
Синтез белков в клетке происходит в рибосомах. Если белки состоят из аминокислот, то они образуются из аминокислот. Если белки состоят из нуклеотидов, то они образуются из нуклеотидов. Если белки состоят из углеводов, то они образуются из углеводов. Если белки состоят из липидов, то они образуются из липидов. Если белки состоят из витаминов, то они образуются из витаминов. Если белки состоят из минеральных веществ, то они образуются из минеральных веществ.



и фосфорной кислоты, синтезируются ферментативно из углеводов, аминокислот и других сравнительно простых соединений.

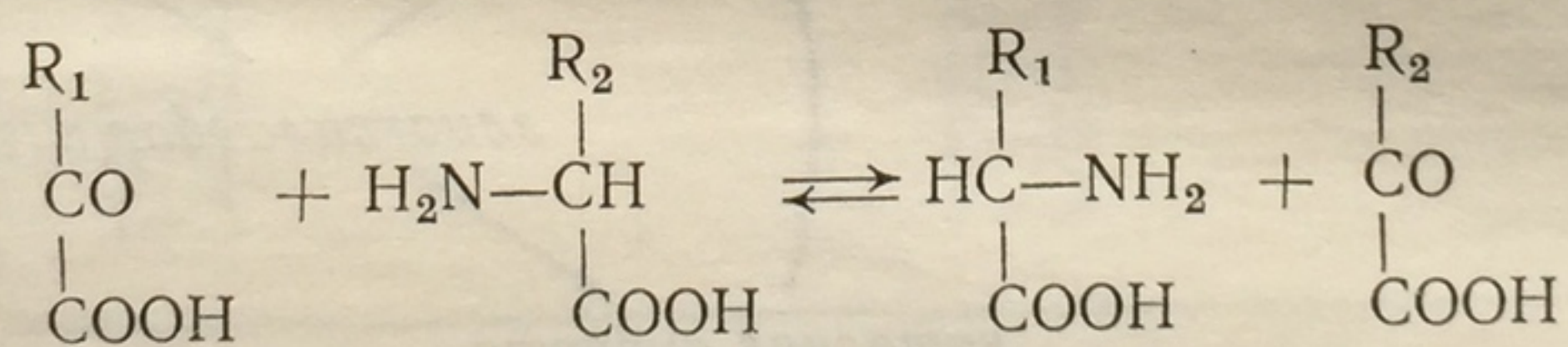
Белки синтезируются на рибосомах из отдельных аминокислот, образуемых самими микроорганизмами. Исключение составляют некоторые ауксотрофные мутанты, для которых необходимо присутствие в среде определенных аминокислот. Биосинтез аминокислот в клетке идет ферментативно из неорганического азота и различных соединений углерода, например продуктов аэробного или анаэробного разложения углеводов. Многие аминокислоты образуются из промежуточных продуктов цикла Кребса: из  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты — глутаминовая кислота, орнитин, аргинин, пролин; из щавелевоуксусной кислоты — L-аспарагиновая кислота, гомосерин, метионин, треонин, диаминопимелиновая кислота, лизин, изолейцин; из пировиноградной кислоты — аланин, валин, лейцин, серин, глицин, цистеин (рис. 17).

Цепь реакций, ведущих к образованию аминокислот, часто кончается действием ферментов дегидрогеназ, катализирующих восстановительное аминирование соответствующих кетокислот. Так, аланин образуется из пировиноградной кислоты:



Аналогичным образом из щавелевоуксусной кислоты образуется аспарагиновая кислота, из  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты — глутаминовая.

Аминокислоты могут получаться в результате переаминирования по схеме



Эти реакции переаминирования катализируют ферменты аминотрансферазы.

Синтез белков в клетке может происходить только в том случае, если имеется комплекс всех необходимых аминокислот. В синтезе белков большое значение имеют нуклеиновые кислоты (см. приложение 8 цветное).

Если белки состоят из 20 аминокислот, то нуклеиновые кислоты образуют только четыре нуклеотида. Каждый из них состоит из молекулы фосфорной кислоты, пентозы (рибозы или дезоксирибозы) и азотистого основания (производного пурина или пиримидина).



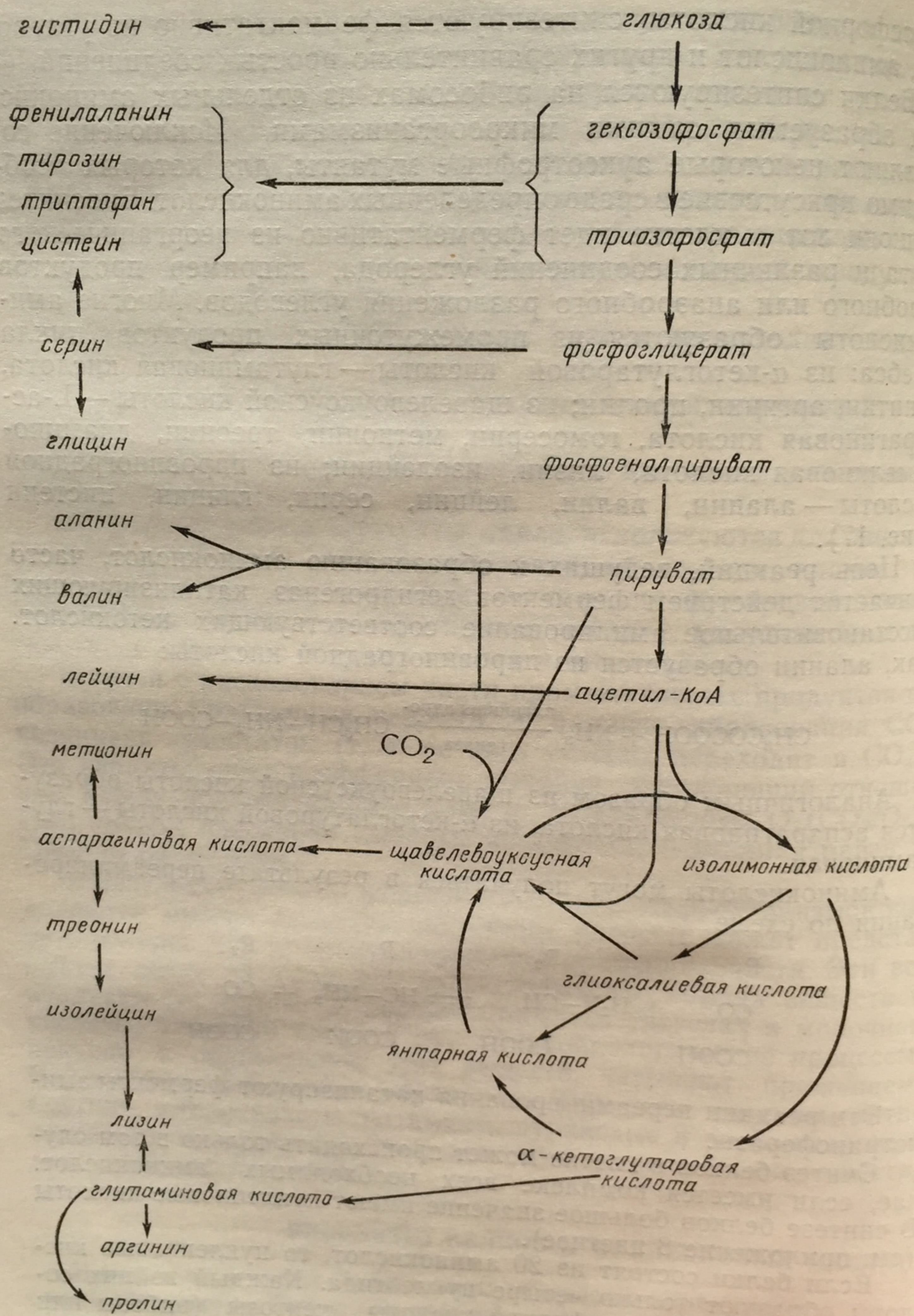


Рис. 17. Схема образования аминокислот



Взаимосвязаны либо только рибонуклеотиды, либо дезоксирибонуклеотиды, которые образуют соответственно РНК (рибонуклеиновую кислоту) или ДНК (дезоксирибонуклеиновую кислоту). В состав молекулы ДНК входят два пуриновых основания — аденин (А) и гуанин (Г), а также два пиримидиновых основания — цитозин (Ц) и тимин (Т). В молекуле РНК вместо тимина находится урацил (У). Следующие друг за другом три азотистых основания или мононуклеотиды в полинуклеотидных цепях РНК или ДНК образуют триплеты, которые соответствуют какой-либо из аминокислот в молекуле белка, а также определяют ее место в цепи аминокислот, образующих белок. Таким образом, последовательность аминокислот в молекуле белка определяется последовательностью триплетов в молекуле ДНК и РНК. Каждый триплет является единицей информации для синтеза белков. Каждая аминокислота кодируется несколькими триплетами. Так, аланин кодируется четырьмя триплетами — АУЦ, ГЦУ, ГЦЦ и ГЦГ. Такая возможность вытекает из того, что число комбинаций из четырех нуклеотидов равно 64 ( $4^3=64$ ), а аминокислот всего 20.

Первичная информация о синтезе белков содержится в ДНК. Именно здесь последовательность триплетов генетически определяет всю последовательность аминокислот в белках.

Передача информации дочерним клеткам в процессе деления происходит по принципу комплементарности. Оказалось, что каждое из упомянутых азотистых оснований имеет свою комплементарную пару:

В молекуле ДНК	В молекуле РНК
А—Т	А—У
Г—Ц	Ц—Г
Ц—Г	Г—Ц
Т—А	У—А

Следовательно, каждому нуклеотиду соответствует свой антинуклеотид, а каждому триплету — свой комплементарный антитриплет или антикодон. При комплементарном соединении кодонов ДНК с соответствующими антикодонами образуется вторая молекула ДНК, равная по длине цепочки и количеству нуклеотидов первой. Они образуют так называемую двойную спираль, в таком состоянии цепи молекулы ДНК могут оставаться значительное время. Комплементарная цепь ДНК может образоваться только в том случае, если в среде имеется достаточное количество свободных нуклеотидов и фермент ДНК-полимеразы (рис. 18). Этот фермент катализирует синтез между-







молекулу РНК, каждый триплет (кодон) которой строго соответствует триплету в молекуле ДНК. Таким образом получают матрицу для синтеза белка. Синтезированную в ядре на основе ДНК молекулу РНК называют информационной (и-РНК), или матричной (м-РНК), рибонуклеиновой кислотой. Молекула ДНК содержит десятки тысяч триплетов и вместе с этим огромное количество информации, обеспечивающей синтез сотен различных ферментов. и-РНК образуется не одновременно по всей длине молекулы ДНК, а на отдельных ее участках (цистронах или генах), каждый из которых несет информацию о синтезе отдельных белков (ферментов). Молекулярная масса и-РНК значительно меньше, чем ДНК, поэтому они более подвижны и свободно перемещаются в ядре и протоплазме.

Синтез белков из аминокислот идет на рибосомах, в состав которых входит рибосомальная РНК (р-РНК). Функция рибосом состоит, надо полагать, в удержании и-РНК в развернутом состоянии, чтобы все ее кодоны были легко доступны и и-РНК могла бы осуществить свои функции, как матрица. Цепь и-РНК одновременно связывается с несколькими рибосомами, образуя активный структурный элемент для синтеза белка,—полисому.

К кодону и-РНК присоединяются не свободные аминокислоты, а их переносчики — антикодон транспортной рибонуклеиновой кислоты (т-РНК). В молекуле т-РНК есть два активных участка — антикодон, который соединяется с кодоном и-РНК, и участок с триплетом ЦЦА, связывающимся с активирующим аминокислоты ферментом аминоксил-т-РНК-синтетазой. Эти ферменты специфичны по отношению к соответствующим аминокислотам. В активации аминокислот принимает также участие АТФ. Соединение антикодона т-РНК с кодоном и-РНК происходит только после образования комплекса аминокислота — фермент — т-РНК. Следовательно, из фонда клеточных аминокислот т-РНК выбирает соответствующую своему антикодону аминокислоту и занимает свое место на кодоне и-РНК.

Рядом с этим кодоном свое место занимает другая т-РНК с соответствующим антикодоном. Между обеими аминокислотами образуется пептидная связь. Затем и-РНК перемещается в полисому на участок одного кодона и за второй аминокислотой на новый кодон поступает соответствующая третья аминокислота и т. д. Так все кодоны матрицы протягиваются через участок сборки аминокислот в рибосоме, в результате образуется соответствующая матрице полипептидная цепь.

Количество простых белков (протеинов) в клетке невелико. Обычно они играют пассивную роль резервных веществ.

В клетке кроме белков и нуклеиновых кислот имеются высокомолекулярные углеводы и липиды. Подробно биосинтез этих



веществ рассматривается в специальных разделах. Углеводы в клетках гетеротрофных микроорганизмов синтезируются из соединений, содержащих 2—3 атома углерода (например, из пирувата), в присутствии АТФ через образование активированных фосфорилированных промежуточных продуктов.

Липиды в клетках микроорганизмов находятся в виде жиров, жирных кислот, фосфатидов, стерина, каротиноидов и других водонерастворимых соединений. Считают, что молекулы липидов синтезируются из двууглеродных фрагментов — остатков уксусной кислоты. В этом синтезе принимает участие КоА.

### ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ МЕТАБОЛИЗМА

Согласованный биосинтез клеточных компонентов регулируется очень точными и целенаправленными механизмами регуляции ферментативных процессов, выработанными в ходе длительной эволюции. В этой регуляции изменяется либо количество соответствующих ферментов, либо их активность.

Изменение количества синтезируемых ферментов в клетке идет в результате действия механизмов индукции и репрессии. Индукцией называют процесс увеличения количества соответствующего фермента в клетке под влиянием субстрата. Последний индуцирует образование главным образом ферментов обмена веществ в процессах энергетического катаболизма. Если в состав ДНК входит несколько генов, определяющих синтез относящихся к разным субстратам ферментов, то в конкретных условиях среды, содержащей определенные субстраты, целесообразно синтезировать только те ферменты, для действия которых в среде имеется субстрат.

Теория, разработанная Жакобом и Моно, дает понятие о механизме индукции ферментов. Синтез ферментов, как уже было сказано выше, определяют участки молекулы ДНК — цистроны, или структурные гены. Помимо них в молекуле ДНК имеются также регуляторные гены, контролирующие деятельность структурных генов. Гены-регуляторы вызывают или прекращают синтез особых веществ белковой природы — репрессоров. Они специфически блокируют соответствующий структурный ген, прекращая таким образом синтез и-РНК и вместе с этим синтез определенного ферментного белка (рис. 19).

Если в клетку из окружающей среды попадает индуктор фермента — субстрат (например, лактоза, являющаяся индуктором  $\beta$ -галактозидазы), то он инактивирует репрессор, структурный ген освобождается и происходит синтез  $\beta$ -галактозидазы. Такие синтезируемые в определенных условиях ферменты называют

индуцированными  
торых в клетке  
В рассмотрен  
в конечные проду  
ного фермента  
продукта из субс

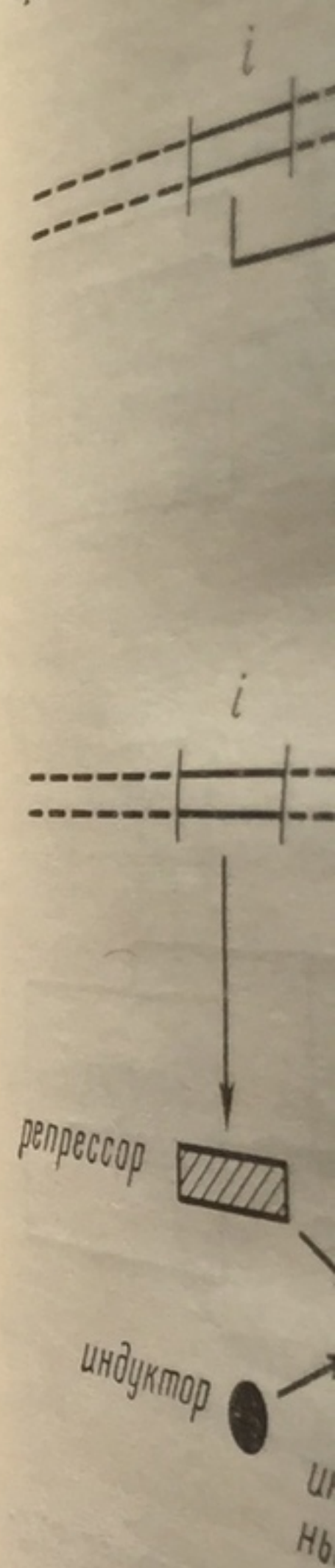


Рис. 19. Схема регуляции ферментов  
I — без индуктора, II — с индуктором

принимают участие в синтезе ферментов (рис. 19). Наблюдаются случаи, когда субстрат действует на ферменты, затем реакция, затем биосинтез следующего фермента. Это явление называется индуцированием. Например, лактоза индуцирует синтез  $\beta$ -галактозидазы. Такие ферменты называют индуцируемыми.



индуцированными, в отличие от конститутивных, количество которых в клетке постоянно.

В рассмотренном примере превращение субстрата — лактозы в конечные продукты глюкозу и галактозу идет при участии одного фермента  $\beta$ -галактозидазы. Если образование конечного продукта из субстрата проходит несколько стадий, то в процессе

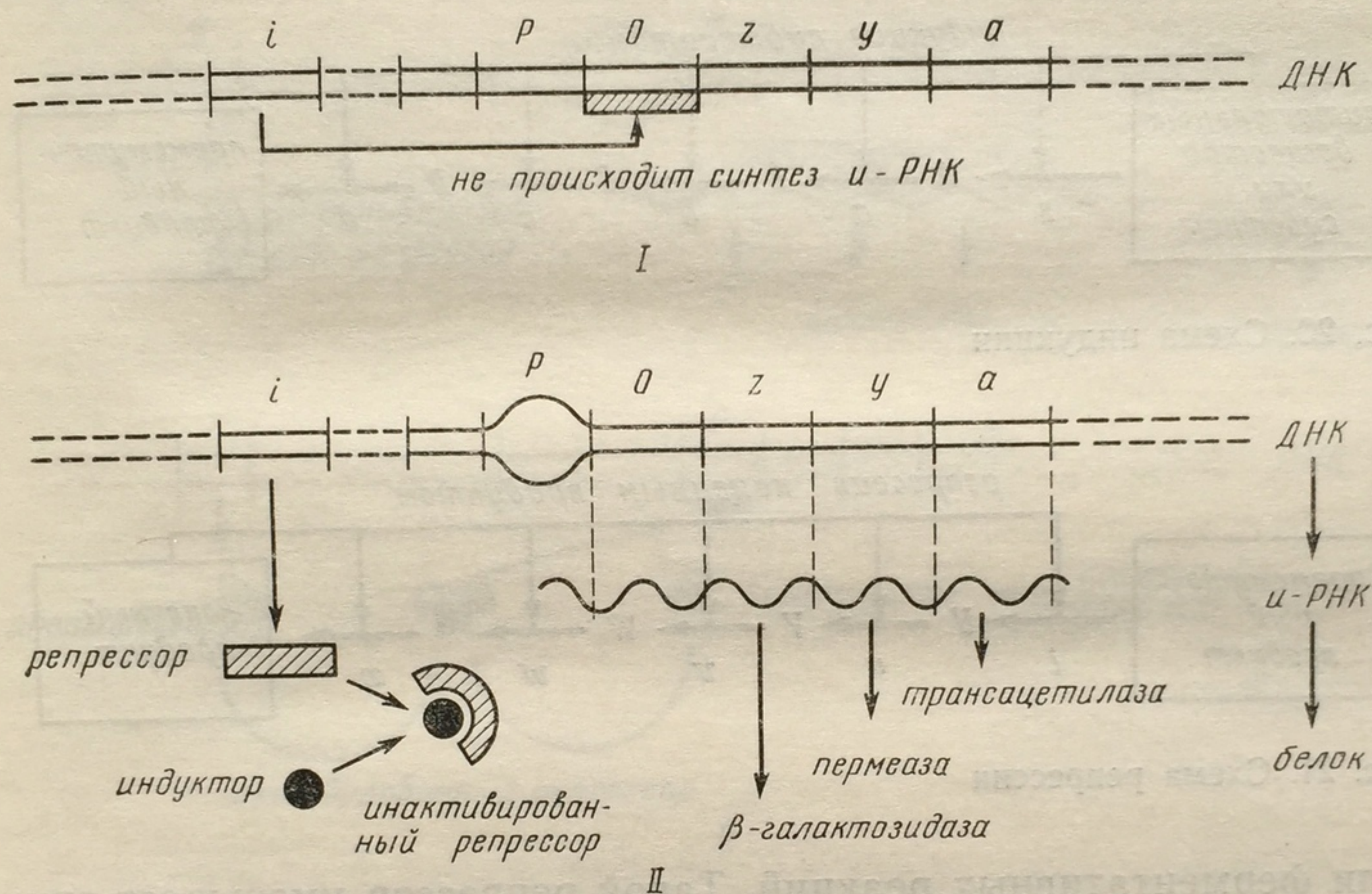


Рис. 19. Схема регуляторного механизма процесса индукции:  
I — без индуктора, II — в присутствии индуктора

принимают участие несколько ферментов. В таких случаях субстрат сам может координированно регулировать биосинтез этих ферментов (рис. 20).

Наблюдаются и такие цепи катаболических реакций, когда субстрат действует как индуктор фермента только для первой реакции, затем первый промежуточный продукт А индуцирует биосинтез следующего фермента и т. д. Использование регуляторного механизма индукции ферментов дает возможность значительно увеличить синтез этих ферментов. При длительном выращивании культуры *E. coli* на среде с лактозой содержание  $\beta$ -галактозидазы увеличивается в 1000 раз. После индукции количество этого фермента в клетке достигает 3% общего содержания белков. Аналогичная картина наблюдается при работе с продуцентом амилазы — плесневыми грибами рода *Aspergillus*.



Образование анаболических ферментов (процесс биосинтеза) регулируется главным образом механизмом репрессии. Репрессией называют процесс уменьшения скорости биосинтеза какого-либо фермента или группы ферментов, катализирующих цепную реакцию определенного процесса при помощи специальных веществ — репрессоров. Им может быть конечный продукт

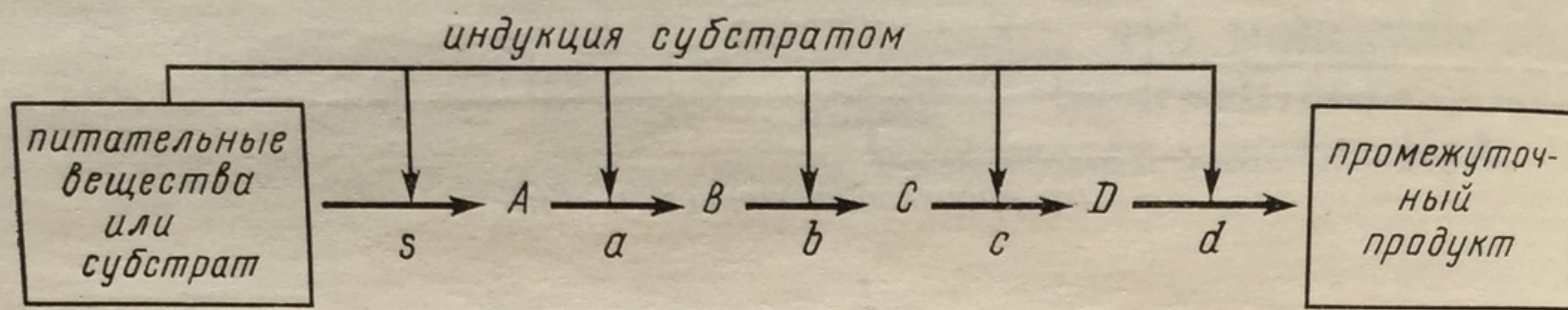


Рис. 20. Схема индукции

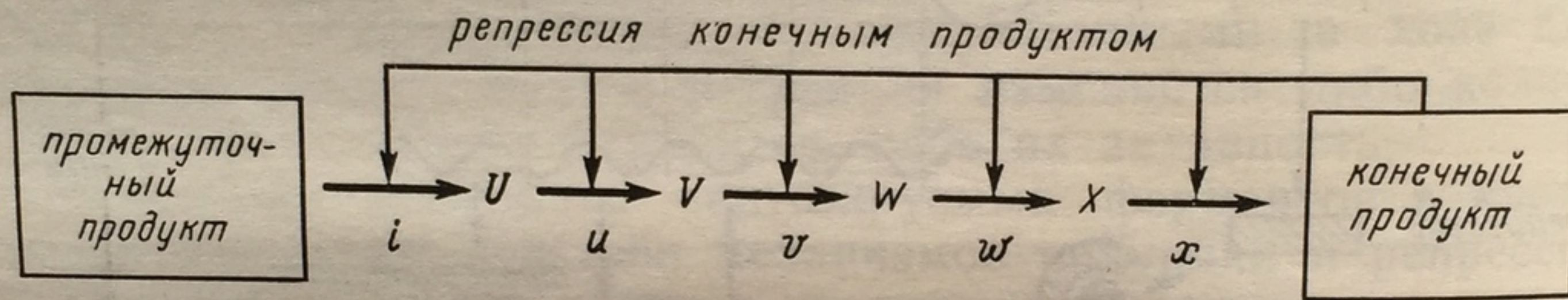


Рис. 21. Схема репрессии

цепи ферментативных реакций. Такой репрессор уменьшает скорость синтеза ферментов во всей цепи анаболических реакций (рис. 21).

Регуляторный механизм репрессии конечным продуктом показан на рис. 22. Из него видно, что ген-регулятор образует апорепрессор, превращающийся в репрессор только после связи с конечным продуктом реакций — корепрессором. Только в таком связанном виде репрессор блокирует ген-оператор и прекращает синтез фермента.

В регуляции катаболизма репрессорами могут быть исходные или промежуточные продукты. При помощи этого механизма регуляции бактерии *E. coli* из двух источников углерода — глюкозы и сорбозы вначале используют легко катаболизируемую глюкозу. Этот углевод в данном случае является репрессором ферментов катаболизма сорбозы. После использования глюкозы репрессия заканчивается и новый субстрат — сорбоза индуцирует синтез новых ферментов. Явление, когда культура микроорганизмов использует несколько различных субстратов среды не одновременно, а постепенно один за другим, называют диауксией.

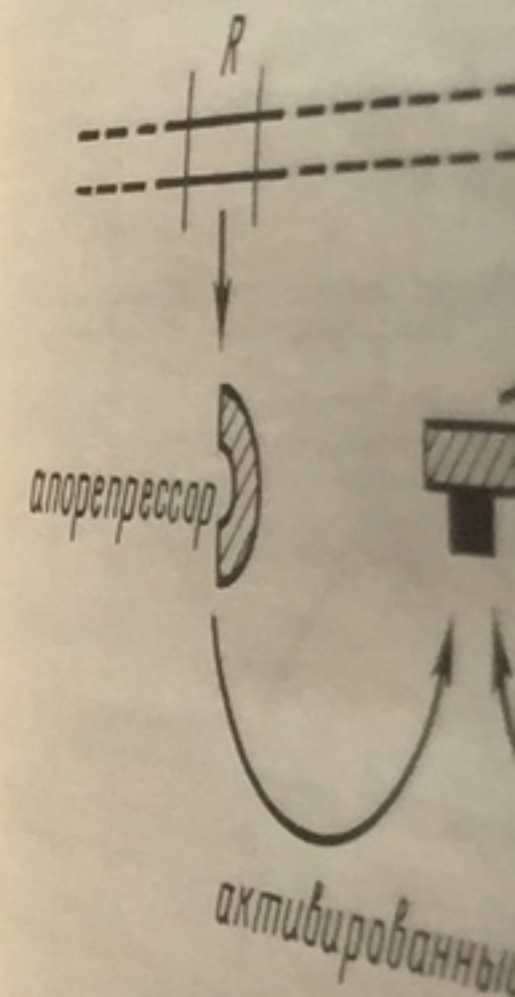
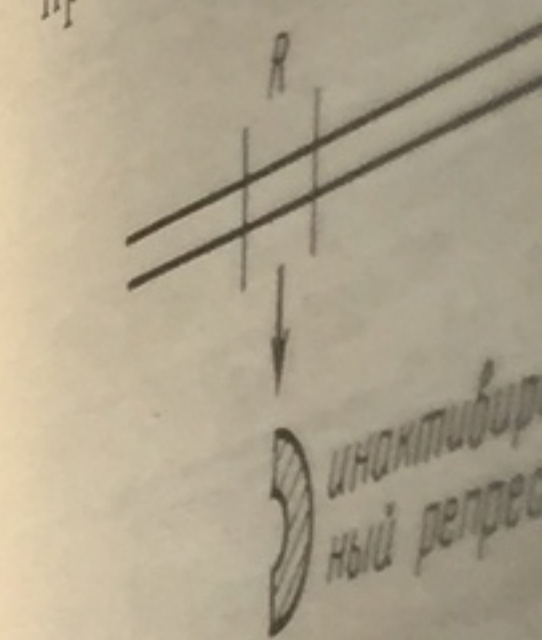


Рис. 22. Схема регуляторного механизма репрессии конечным продуктом. I — без конечного продукта, II — с конечным продуктом

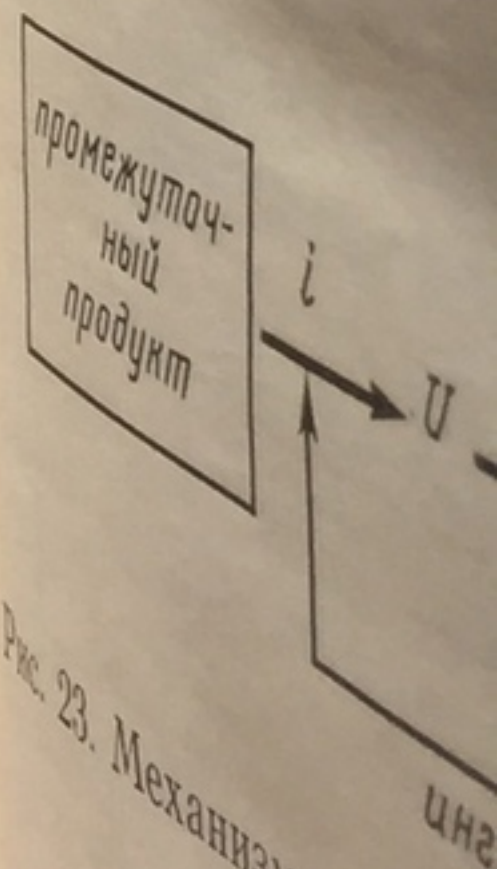


Рис. 23. Механизм ингибирования

Наиболее важные ферменты уже существуют в виде ферментов, проводящих реакцию. Продукты реакции ферменты многократно



Для успешного проведения микробиологического синтеза необходимо знать метаболизм соответствующей культуры и следить за тем, чтобы в составе среды роста не было репрессирующих веществ.

Надо отметить, что регуляторные механизмы индукции и репрессии действуют сравнительно медленно.

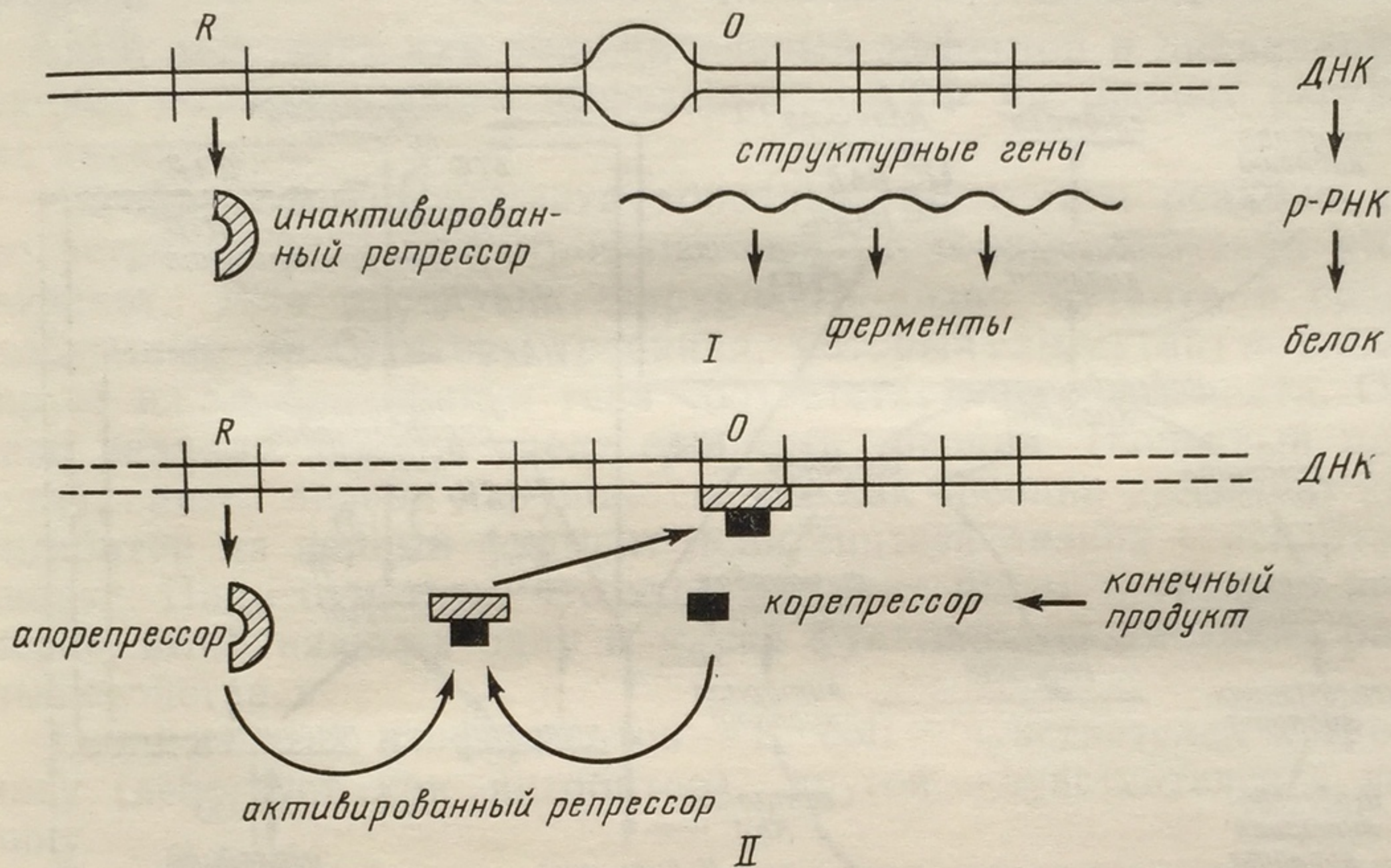


Рис. 22. Схема регуляторного механизма процесса репрессии: I — без конечного продукта, II — в присутствии конечного продукта

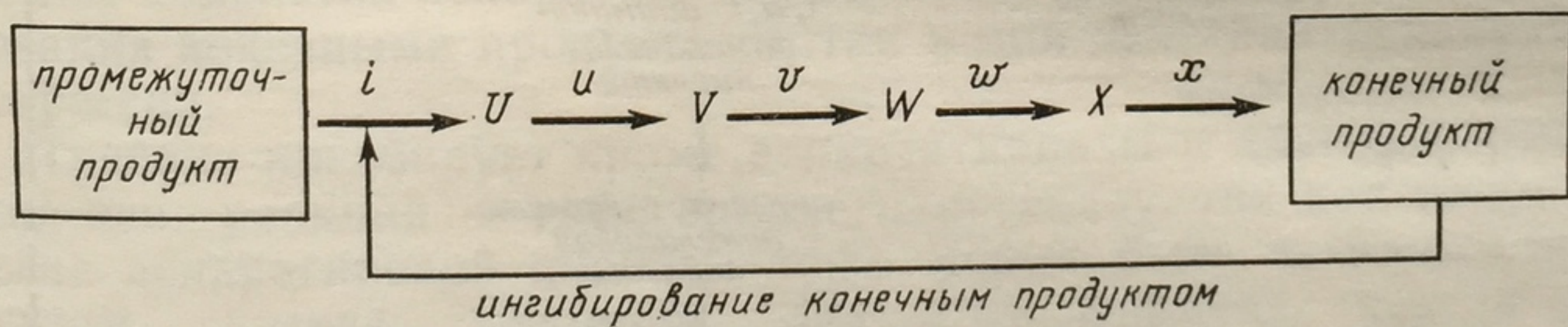


Рис. 23. Механизм ингибирования конечным продуктом реакции

Наиболее важные реакции в клетке, катализируемые аллостерическими ферментами, регулируются изменением активности уже существующих в клетке ферментов. В этом случае регуляция проводится очень быстро. Ферменты ингибируются конечным продуктом реакции, причем ингибитор действует не на все ферменты многочленной цепи реакций, а только на первый



фермент (рис. 23). Конечный продукт реакции, соединяясь с аллостерическим центром фермента, надо полагать, изменяет его конфигурацию, что уменьшает каталитическую активность фермента.

Примером регуляции ферментной активности может быть широко известный в микробиологии эффект Пастера — прекращение спиртового брожения дрожжей при введении в среду

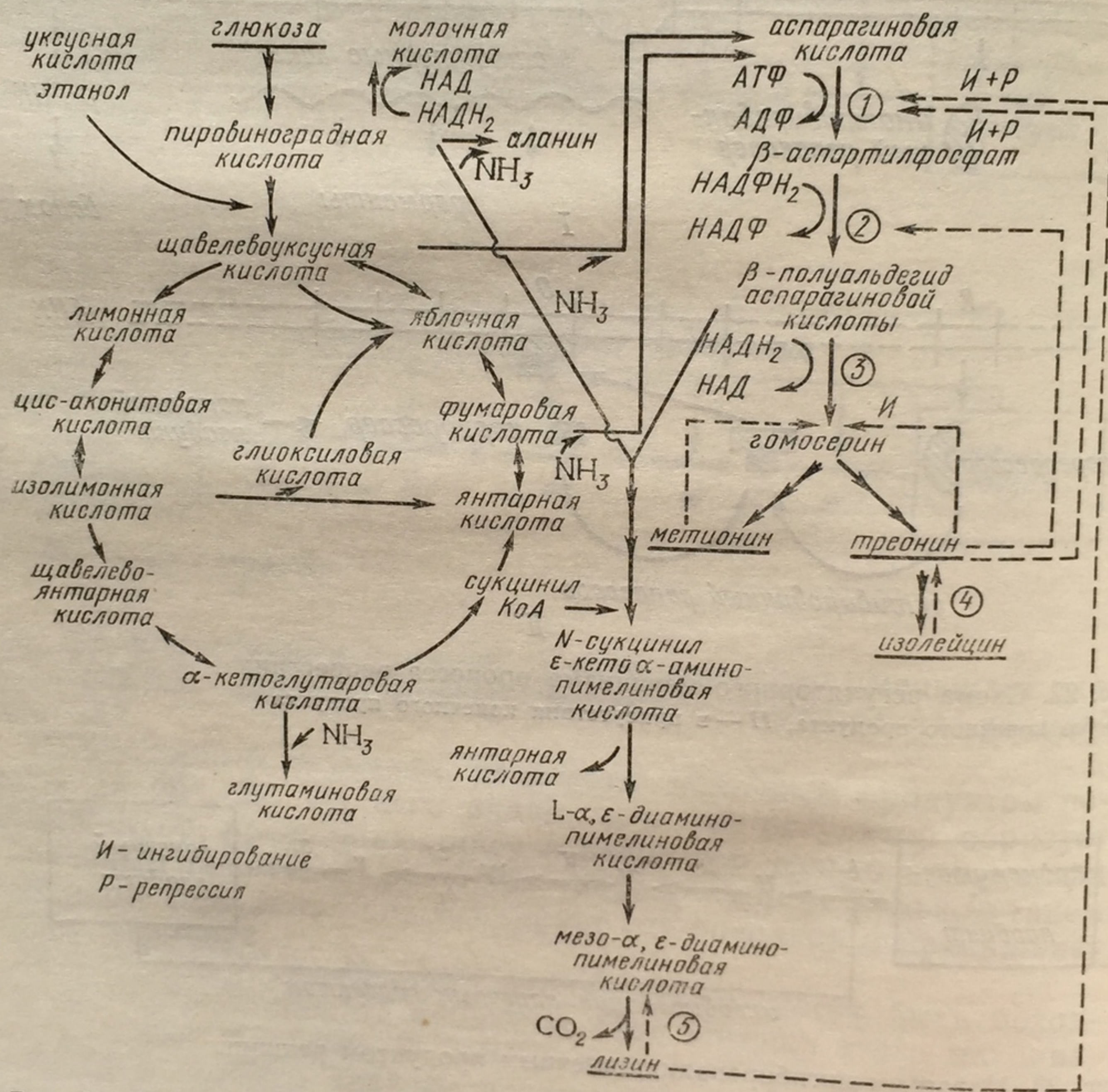


Рис. 24. Химизм биосинтеза лизина

кислорода. Считают, что в основе этого эффекта лежит регуляция активности фермента гликолиза — фосфофруктокиназы. Этот фермент ингибирует конечный продукт энергетического обмена веществ — АТФ. В присутствии кислорода дрожжи способны получить из каждой единицы субстрата в 20—25 раз



больше энергии, метаболизируя его через цикл Кребса до  $\text{CO}_2$  и воды. Одновременно синтезируется очень большое количество АТФ, которая, будучи ингибитором фосфофруктокиназы, прекращает невыгодный для клетки путь получения энергии — гликолиз. Так прекращается весь процесс гликолиза при ингибировании только одного фермента этого сложного многостадийного процесса.

АМФ действует как положительный эффектор и ликвидирует влияние отрицательного эффектора — АТФ на процесс регуляции активности.

Ингибирование фермента конечным продуктом реакции часто встречается у ауксотрофных мутантов при получении аминокислот. Для роста синтезирующего лизин мутанта в среде необходимо присутствие треонина, который сам мутант не синтезирует из-за блокировки гена соответствующего фермента. Однако вначале, пока в среде еще есть треонин (конечный продукт), синтез лизина нарушается, так как треонин действует как ингибитор на первый фермент цепи синтеза лизина — аспартаткиназу. Надо отметить, что этот фермент имеет несколько изомеров, выполняющих одну и ту же функцию, но имеющих разные свойства.

Один из этих изоферментов — *E. coli* — чувствителен к треонину (действует как ингибитор), другой — чувствителен к лизину.

В метаболизме клетки при биосинтезе отдельных компонентов обычно одновременно действует несколько регуляторных механизмов.

Как видно из рис. 24, регуляция ферментов биосинтеза аминокислот семейства аспарагиновой кислоты идет как путем ингибирования конечными продуктами, так и при действии механизмов репрессии.

Треонин ингибирует кроме аспартаткиназы и другой фермент этой цепи реакций — гомосериндегидрогеназу, так как полуальдегид аспарагиновой кислоты тоже может быть исходным продуктом синтеза треонина. На этот фермент, как и на аспартаткиназу, треонин действует как ингибитор или репрессор.

В регуляции метаболизма большую роль играет циклический аденозинмонофосфат — ц-АМФ, синтезирующийся из АТФ. Доказано, что ц-АМФ может снять катаболитную реессию.

Глубокое изучение механизмов регуляции ферментативных процессов, используемых в производстве культур микроорганизмов, дает возможность выбрать оптимальную среду выращивания для обеспечения высокого выхода полезного продукта.



### Глава III

## КУЛЬТИВИРОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ

### ОПТИМАЛЬНЫЕ УСЛОВИЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

Чтобы культура микроорганизмов могла нормально расти, размножаться и осуществлять биосинтез какого-то вещества, необходимы оптимальные условия окружающей среды: химические факторы — состав и концентрация питательных веществ, присутствие активаторов и ингибиторов; физические факторы — температура, давление, реакция, плотность, подвижность среды, освещение, радиация и т. д. При нарушении оптимальных границ этих факторов нарушается обмен веществ, прекращается или ограничивается рост и размножение культуры.

**Питательные среды.** Источниками углерода в питательной среде для гетеротрофных микроорганизмов могут быть углеводы (моносахариды, полисахариды), спирты, кислоты, углеводороды и др. Концентрация этих веществ в среде может изменяться от десятых долей процента до 20%. Абсолютное содержание источника углерода для получения определенного количества нужного метаболита или биомассы рассчитывают, используя экспериментально определенные экономические коэффициенты выхода.

Источниками азота в питательной среде могут быть белки, пептиды, аминокислоты, соли аммония или аммиака, нитраты, а также атмосферный азот. Количество азотсодержащих веществ для образования биомассы можно вычислить, если известно содержание азота в данной биомассе и вероятный урожай ее. Обычно принимают, что 5% азота остается в питательной среде неиспользованным.

В качестве источника фосфора обычно используют фосфаты. Кроме того, к питательной среде добавляют соли K, Mg, Fe и различные органические вещества.

Потребность микроорганизмов в соответствующих веществах выясняют, культивируя их на синтетических средах, которые состоят из компонентов чистых веществ. Изменяя количество одного из компонентов среды и сохраняя остальные на оптимальном уровне, можно установить, какие вещества и в каких концентрациях необходимы для культивирования соответствующего микроорганизма. В лабораториях аэробные микроорганизмы культивируют в пробирках или колбах, которые помещают в специальные качалки.

Готовя синтетические среды, ценный комплекс минеральных, магния и других элементов, среду в сравнительно большом количестве некоторых элементов, бальта, марганца и меди и образование витаминов групп, выяснить воздействие этих микроорганизмов и биосинтез, химо проводить в среде, при ной воде из перекристаллизованной посуды из особого стекла или

Таблица 4. Содержание биологически

Биологически активные вещества	
Биотин	
Фолиевая кислота	
Парааминобензойная кислота	
Тиамин	
Паридоксин	
Пантотенат Са	
Рибофлавин	
Никотиновая кислота	
L-аланин	
Холин	
Инозит	
Пуриновые и пиримидиновые основания	

Так как витамины являются важными компонентами питательной среды, то их концентрация в питательной среде должна быть оптимальной. Если концентрация витаминов в питательной среде будет слишком высокой, то это может привести к ингибированию роста микроорганизмов. В лабораториях часто используют готовые питательные среды, в которых уже содержатся все необходимые витамины. Для культивирования микроорганизмов в твердой среде, например на агаре, используют специальные питательные среды, в которых уже содержатся все необходимые витамины. Большинство гетеротрофных микроорганизмов не могут синтезировать витамины, поэтому их необходимо добавлять к синтетическим средам.



Готовя синтетические среды, необходимо обеспечить полноценный комплекс минеральных веществ. Кроме калия, фосфора, магния и других элементов, которые добавляют в питательную среду в сравнительно больших количествах, иногда для нормального развития культуры необходимо незначительное количество некоторых элементов. Так, несколько микрограммов кобальта, марганца и меди на 100 г питательной среды изменяют образование витаминов группы В в биомассе дрожжей. Чтобы выяснить воздействие этих микроэлементов на рост культуры микроорганизмов и биосинтез различных веществ, опыты необходимо проводить в среде, приготовленной на бидистиллированной воде из перекристаллизованных солей, при использовании посуды из особого стекла или особой пластмассы.

Таблица 4. Содержание биологически активных веществ в питательной среде

Биологически активные вещества	Концентрация, мкг/л	
	минимум	оптимум
Биотин	0,002—0,01	0,1—1,0
Фолиевая кислота	0,02	0,5—0,5
Парааминобензойная кислота	0,01	0,02
Тиамин	0,1—0,3	1—100
Пиридоксин	0,1	10—1000
Пантотенат Са	4	20—1000
Рибофлавин	5	10—1000
Никотиновая кислота	5—10	100—1000
L-аланин	200	500—1000
Холин	20	1000—2000
Инозит	1000	2000—6000
Пуриновые и пиримидиновые основания	1000	5000—10000

Так как витамины являются очень активными веществами, их концентрация в питательной среде невелика (табл. 4). Оптимальное количество витаминов и других активных веществ для определенных культур микроорганизмов варьирует в очень широких пределах. Если соответствующие микроорганизмы культивируют на твердой среде, к ней добавляют 1,5—2% агара.

В лабораториях часто применяют природные питательные среды. Для культивирования некоторых микроорганизмов используют мясной отвар в виде мясо-пептонного бульона или мясо-пептонного агара, солодовое сусло, молоко и т. п.

Большинство гетеротрофных микроорганизмов хорошо развивается на среде с дрожжевым экстрактом или автолизатом, которые добавляют к синтетической среде.



Для выращивания дрожжей, бактерий и плесневых грибов широко используют солодовое или пивное сусло, которые содержат 8—12% сахара, главным образом в виде мальтозы, декстрины, азотсодержащие, минеральные вещества, витамины и другие необходимые компоненты. Природные питательные среды готовят также из экстрактов молока, картофеля, бобов или овощей, из плодовых или ягодных соков и т. д.

В промышленности для культивирования микроорганизмов обычно применяют полусинтетические или природные субстраты.

Источником углерода часто бывает меласса, источником биологически активных веществ — кукурузный, дрожжевой экстракты и др. Дозировки этих природных продуктов в среду необходимо регулировать в соответствии с оптимальными границами концентраций наиболее важных активных веществ для данной культуры.

Если на клетки микроорганизмов воздействуют слишком высокие концентрации веществ в растворе, может произойти плазмолиз — часть воды выйдет из клеток и протоплазма отойдет от клеточной стенки. Это явление можно наблюдать в микроскоп если, например, поместить дрожжевые клетки в каплю 2—5%-ного раствора NaCl. Большинство бактерий легко переносят 0,5—3%-ную концентрацию солей, а галофильные микроорганизмы выдерживают даже 29%-ную концентрацию. Следует отметить, что по осмотической активности 20%-ный раствор соли эквивалентен 60%-ному раствору сахара, т. е. поваренная соль осмотически в 3 раза активнее.

Информацию о влиянии некоторых веществ на рост дрожжей дает табл. 5.

Таблица 5. Влияние вредных примесей на рост и размножение хлебопекарных дрожжей

Примеси	Рост за- держива- ется	Рост пол- ностью останав- ливается	Примеси	Рост за- держива- ется	Рост пол- ностью останав- ливается
	при концентрации ингибиторов, %			при концентрации ингибиторов, %	
Органические ки- слоты			Нитриты	0,0005	—
щавелевая	0,001	0,1	Формалин	0,09	—
муравьиная	0,0085	0,2	Фтористый натрий	0,002	—
уксусная	0,02	0,2	Тяжелые металлы		
масляная	0,005	0,05	медь	—	0,005
молочная	1,35	—	серебро	—	0,000001
Сернистый ангид- рид	0,0025	—	мышьяк	—	0,0005



Большое значение в жизни микроорганизмов имеет кислород. Для аэробных микроорганизмов он жизненно необходим, а для анаэробных является ядом.

Промежуточное положение занимают факультативно анаэробные микроорганизмы, например спиртовые дрожжи, которые нормально растут в среде без особого воздушного аэрирования. Метаноокисляющие бактерии, используемые для биосинтеза витамина  $B_{12}$ , не переносят присутствия кислорода, поэтому в начале процесса ферментации через культуральную жидкость продувают  $CO_2$  для деаэрации и перемешивания. При производстве хлебопекарных и кормовых дрожжей среду интенсивно аэрируют, продувая за 1 мин через каждую единицу объема среды 1—2 ед. объема воздуха, причем последний должен быть тонко диспергирован в среде. В среднем можно считать, что в аэробных условиях при окислении глюкозы до  $CO_2$  на каждый грамм глюкозы нужен 1 г кислорода.

Потребление кислорода в среде зависит от концентрации клеток. Чем она выше, тем больше требуется кислорода. Выбирая режим аэрации, надо обеспечить такую скорость растворения кислорода, которая полностью соответствовала бы его расходу.

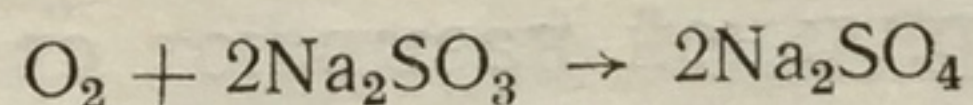
Обеспечивая культуру аэробных микроорганизмов кислородом, надо добиться его максимального растворения в среде. Как известно, при давлении 0,1 МПа ( $1 \text{ кгс/см}^2$ ) и температуре  $30^\circ\text{C}$  в 1 л дистиллированной воды максимально возможное количество растворенного кислорода равно 7,54 мг.

Скорость адсорбции кислорода можно характеризовать уравнением

$$\frac{dC}{dt} = K_V (C_V - C),$$

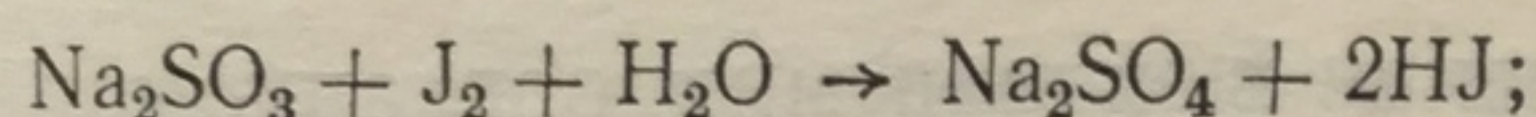
где  $C$  — фактическая концентрация растворенного кислорода, мМоль/л;  
 $C_V$  — концентрация максимально возможного количества растворенного кислорода;  
 $K_V$  — константа скорости растворения кислорода или коэффициент массообмена; коэффициент адсорбции, сульфитное число, Моль  $O_2$ /(л·мин) при давлении 0,1 МПа [на практике широко применяют кг  $O_2$ /(м<sup>3</sup>·ч) или мг  $O_2$ /(л·мин)].

Коэффициент  $K_V$  для каждой системы аэрации можно определить, например, по сульфитному методу. Для этого аппарат заполняют раствором сульфита натрия в воде и затем аэрируют этот раствор в присутствии ионов меди. Кислород реагирует с сульфитом по уравнению



Остаточное количество сульфита оттитровывают йодом.





$$K_V = \frac{200\Delta C \cdot 0,8}{t},$$

где  $\Delta C$  — разность концентрации сульфита за время  $t$  в 5-миллилитровом образце.

Сульфитное число характеризует систему аэрации и интенсивность растворения кислорода. Коэффициент массообмена кислорода  $K_V$  зависит от мощности мешалки, объема жидкости в аппарате, количества воздуха, подаваемого к мешалке, а также от частоты вращения мешалки, ее размеров и формы. Концентрацию растворенного кислорода в среде можно определить полярографически.

Условия питательной среды характеризует окислительно-восстановительный потенциал, выраженный в милливольтках или чаще отрицательным логарифмом давления молекулярного водорода  $r\text{H}_2$ . Для анаэробных микроорганизмов наивысшее значение  $r\text{H}_2$  равно 12, наименьшее — 0. Для аэробных микроорганизмов, например для видов *Azotobacter*,  $r\text{H}_2$  равно 29,6, для дрожжей — 10—30. За время роста аэробных микроорганизмов редокс-потенциал уменьшается, так как потребляется кислород и в среде накапливаются восстановленные продукты.

Большинство используемых в промышленности микроорганизмов по отношению к температуре являются мезофилами: их развитие происходит при 25—37°C. Психрофильные микроорганизмы растут в интервале 0—15°C, а термофильные — в интервале 55—75°C. Все перечисленные группы имеют промежуточные формы. Обычно при повышении температуры процессы биосинтеза интенсифицируются, если это повышение не ингибирует определяющие биосинтез ферменты. Для биосинтетических процессов желательно использовать термофильные микроорганизмы. Большинство вегетативных микроорганизмов гибнет при температуре 70°C за 1—5 мин.

В микробиологическом синтезе большое значение имеет реакция среды (pH). Для каждой культуры микроорганизмов есть свой оптимум, максимум и минимум pH. Ацидофильным микроорганизмам (некоторые дрожжи, плесени, бактерии) необходим pH 1,5—4,5, нейтрофильным — pH 6,5—8,0, базофильным — pH 8,5—9,5. Большинство микроорганизмов лучше всего развивается в нейтральной среде при pH 7,0.

На рост и биосинтез микробных культур влияют также различные ядовитые вещества.

**Стерильность.** Стерильной называют среду (например, питательный раствор, поверхность или помещение), в которой отсутствуют живые формы микроорганизмов. Стерильность обеспечи-



вают, обрабатывая соответствующий объект физическими (температура, облучение, фильтрация) или химическими средствами. В результате клеточные коллоиды микроорганизмов необратимо коагулируют. Чем выше температура и влажность клеточной массы, тем выше летальность. Так, яичный белок влажностью 50% коагулирует при 56°C, влажностью 25% — при 76°C, влажностью 5% — при 149°C. Коагуляцию белков вызывает также присутствие ионов металлов, причем коагулирующий эффект зависит от их валентности и атомной массы. В присутствии трехвалентных ионов тяжелых металлов белки коагулируют более полно, чем в присутствии двухвалентных. Органические вещества, например спирт, фенол, формалин и их производные, также вызывают коагуляцию белков.

Гибель микроорганизмов способны вызвать химические вещества, которые специфически или неспецифически связываются с белками, инактивируя определенные группы активных ферментов. К таким неспецифическим веществам относятся хлор, иод, формалин, а к специфическим — антибиотики, сульфамидные препараты и т. д. Летальное или бактериостатическое воздействие некоторых химических веществ (например, полимиксина) связано с их концентрированием на поверхности клеток или ферментов и созданием глубоких изменений в процессах проницаемости и транспорта веществ.

На практике чаще всего используют влажную и сухую стерилизацию жаром, а также стерилизацию фильтрованием. Примером влажной стерилизации может служить стерилизация посуды и сред автоклавированием.

Чем выше температура, тем короче стерилизация. В процессе термической стерилизации происходит необратимая денатурация белков клеток, и вместе с этим ферменты теряют свою активность. Если вода кипит при нормальном давлении, ее температура равна 100°C, при повышении давления температура кипения также повышается (табл. 6).

Таблица 6. Взаимосвязь давления и температуры кипения

Давление		Температура, °C
кПа	кгс/см <sup>2</sup>	
0	0	100
35	0,35	108
70	0,7	106
105	1,05	122
140	1,4	126



Производственные установки стерилизуют паром при давлении 150—200 кПа (1,5—2 кгс/см<sup>2</sup>) в течение часа. Если аппаратура сильно инфицирована, дополнительно применяют формалин. В этом случае используют комбинированную термическо-химическую стерилизацию.

Вегетативные формы микробных клеток убивают кипячением (температура 100°C) или пастеризацией растворов (температура ниже 100°C). Летальный эффект можно увеличить добавлением карбоната натрия (2%). В этих условиях в течение 10 мин инактивируются также и споры.

Сухая стерилизация менее эффективна, чем влажная термическая. В сухой атмосфере (сушильный шкаф) при температуре 165—170°C споры гибнут в течение 2 ч. В этих условиях происходит не только денатурация, но и обугливание белков. После сухой стерилизации лабораторной посуды оберточная бумага становится коричневой.

Дезинфекция — уничтожение патогенной микрофлоры с помощью химических веществ. На практике используют различные группы дезинфицирующих веществ:

- 1) галогены и их производные (0,5—5%-ный раствор хлорной извести, 7%-ный раствор иода в спирте и др.);
- 2) соединения тяжелых металлов (растворы ртути, серебра или меди 1 : 1000);
- 3) фенол и его производные (в виде 1—5%-ной суспензии);
- 4) летучие дезинфицирующие вещества (спирты, формальдегид, хлороформ, β-пропиолактан, окись этилена и др.).

Бактерициды (фунгициды) — вещества (или физические факторы), уничтожающие бактерии (грибы). Если соответствующий фактор не убивает клетку, а только ограничивает ее развитие, то он является бактериостатическим (по отношению к бактериям) и фунгистатическим (по отношению к грибам). К бактерио- и фунгистатическим веществам относится ряд медикаментов, например сульфамидные препараты, парааминобензойная кислота, антибиотики и др. Бактерио- или фунгистатическое воздействие могут оказать также высушивание, замораживание и небольшие дозы облучения. На практике для стерилизации поверхностей и воздушного пространства помещений чаще всего используют излучение ультрафиолетовых ламп.

Наиболее чувствительны к стерилизационным факторам химической и физической природы молодые клетки, особенно в состоянии интенсивного размножения (рис. 25).

Для стерилизации газов и жидкостей иногда используют метод холодной стерилизации — фильтрацию, в основе которой лежит механическое и электростатическое осаждение клеток микроорганизмов на поверхности фильтра. В лабораторной прак-

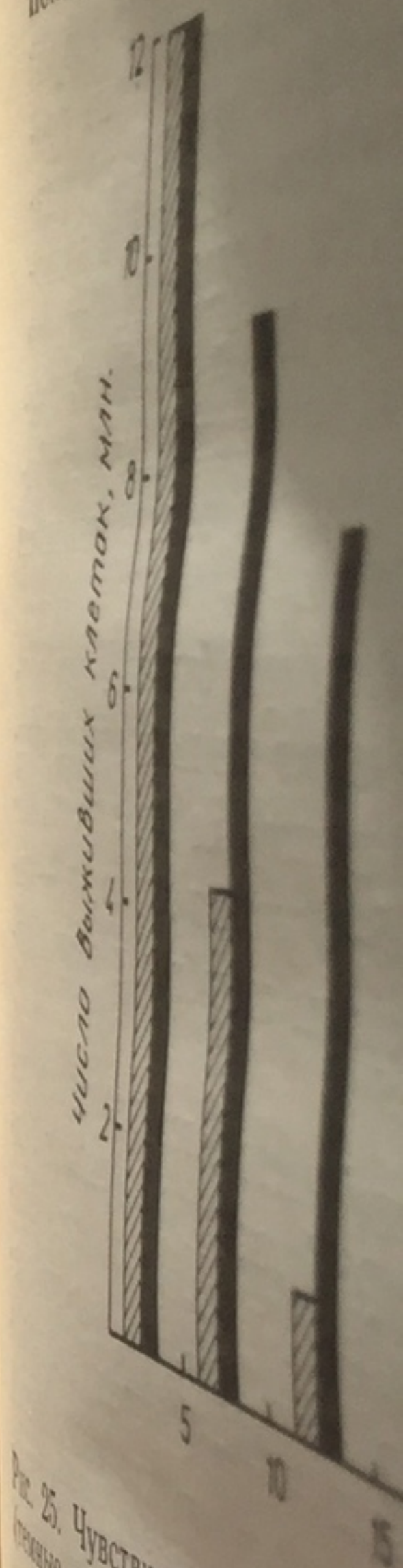


Рис. 25. Чувствительность молодых клеток к воздействию различных факторов стерилизации (столбики) — количество выживших клеток.



тике широко используют фильтры Зейтца, которые представляют собой прессованные асбесто-целлюлозные диски. Применяют также и мембранные диски из коллодия, ацетатной целлюлозы и других подобных материалов. Обычно диаметр пор мембранных фильтров колеблется от 1 до 0,005 мкм. Фильтрацией можно задержать даже вирусы. Для задержки микроорганизмов используют также фаянсо-фарфоровые фильтры.

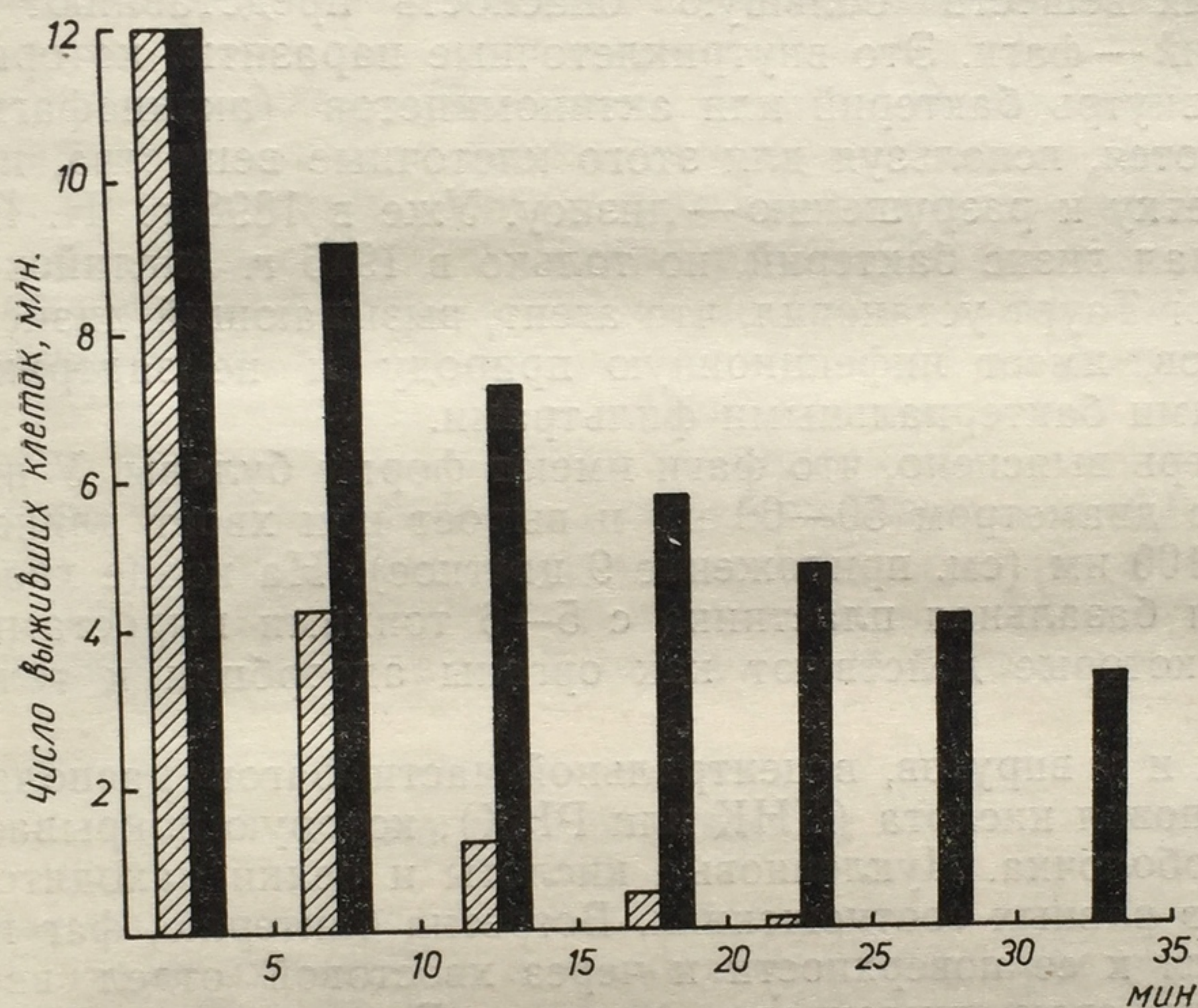


Рис. 25. Чувствительность молодых (заштрихованные столбики) и старых (темные столбики) клеток к воздействию летальных факторов

Фильтрацию жидкостей как метод холодной стерилизации используют также в промышленности в том случае, если какой-либо компонент среды (витамин, фермент) не переносит термическую обработку. Для этих целей можно применять асбесто-целлюлозные пластинки типа СФ (ГОСТ 480—41).

Для стерилизации воздуха в микробиологической промышленности используют стеклянную и простую вату, ткань Петрианова, базальтовое волокно или фильтры из активного угля. Иногда для стерилизации воздуха применяют комбинирование термической обработки, фильтрации и ультрафиолетового облучения. Для очистки воздуха от микрофлоры можно использовать аппараты типа скрубберов, в которых сверху разбрызгивается дезинфицирующее вещество — 10%-ная гидроокись натрия.



рия или 15—20%-ный раствор серной кислоты. В этих аппаратах нельзя применять такие дезинфицирующие вещества, которые, попадая с потоком воздуха в ферментатор, помешали бы процессу биосинтеза.

В производстве стрептомицина, хлортетрациклина, эритромицина и других антибиотиков, а также энтобактерина — средства борьбы с вредителями растений, ацетона, молочной кислоты и других веществ большую опасность представляют вирусы бактерий — фаги. Это внутриклеточные паразиты, которые, проникая внутрь бактерий или актиномицетов (актинофаги), размножаются, используя для этого клеточные вещества, и приводят клетку к разрушению — лизису. Уже в 1898 г. Н. Гамалея наблюдал лизис бактерий, но только в 1915 г. английский бактериолог Таурт установил, что агент, вызывающий лизис стафилококков, имеет инфекционную природу и не задерживается обычными бактериальными фильтрами.

Теперь выяснено, что фаги имеют форму булавы. У них есть головка диаметром 50—60 нм и вырост или хвост длиной примерно 100 нм (см. приложение 9 цветное). На конце хвоста находится базальная пластинка с 5—6 тонкими выростами — нитями, которые действуют как органы адсорбции к телу бактерии.

Как и у вирусов, в центральной части фагов располагается нуклеиновая кислота (ДНК или РНК), которую покрывает белковая оболочка. Нуклеиновые кислоты и белки находятся примерно в равных соотношениях. Встретив бактерию, фаг присоединяется к ее поверхности и через хвостовой отдел вводит в бактерию свою нуклеиновую кислоту. В результате изменяется обмен веществ в клетке бактерии, она прекращает продуцировать вещества, необходимые для роста и развития, и начинает продуцировать фаги в вегетативной форме. В каждой клетке число фагов может достигнуть нескольких сотен и даже тысяч.

После проникновения в клетку фаги размножаются очень быстро. Уже через 10 мин после инфицирования в каждой клетке культуры бактерий можно найти 2—3 фага, а через 20 мин — уже 100. После лизиса бактериальной клетки фаги выделяются из нее и переходят в зрелую форму. Клеточные фаги могут находиться и в форме профагов. В этом случае они, находясь в скрытом состоянии, не уничтожают клетку, а при помощи своей ДНК, связанной с ДНК клетки, синхронно репродуцируются вместе с клеткой. Если клетки бактерий, содержащие профаги, попадают в неблагоприятные условия (воздействие ультрафиолетовых лучей или ядовитых соединений), профаги могут перейти в вегетативную форму, размножиться и лизировать клетку. Такие культуры бактерий, содержащие профаги, называют ли-



зогенными. В природе фаги широко распространены именно в виде лизогенных культур. Фаги многих бактерий и актиномицетов выделены из почвы.

Для предотвращения фаговой инфекции стараются работать с фагоустойчивыми культурами. Их получают путем селекции, постепенно и систематически воздействуя на исходную культуру фагами или мутагенными факторами. Очень важно своевременно обнаружить присутствие фага и ликвидировать источник инфекции.

Фаги погибают под действием в течение 30 мин температуры 100°C и выше. В борьбе с фагами можно применять также хлорсодержащие соединения (гипохлорид или хлорную известь, хлорамин и др.) в виде 0,05—0,1%-ных растворов или в виде аэрозолей. Особенно эффективен алкилметилбензиламмонийхлорид, который при концентрации активного хлора 0,1% в течение 5—6с полностью инактивирует фаги. При использовании аэрозолей влажность воздуха должна быть не менее 50%. В качестве эффективного противофагового средства используется 0,02%-ный йодоформ (только он отрицательно воздействует на органы дыхания), 0,25%-ный раствор перманганата калия, 3%-ный раствор перекиси водорода и 5%-ный раствор формалина.

### РОСТ И РАЗМНОЖЕНИЕ

В благоприятных условиях, т. е. в среде, где есть водный раствор питательных веществ, а также соответствующие физические и химические факторы (температура, рН,  $O_2$ ) в клетках микроорганизмов начинаются ферментативные процессы, обмен веществ с окружающей средой. Из веществ, проникших в клетку, образуются внутриклеточные вещества и структурные элементы. Одновременно идут процессы распада веществ — диссимиляции. Если анаболические процессы преобладают над катаболическими, наблюдается рост клетки, увеличение ее размеров. Достигнув определенных размеров в соответствующей фазе развития, клетка может начать размножаться. Скорость размножения зависит как от видовых свойств культуры, так и от условий окружающей среды. В благоприятных условиях каждое следующее поколение у дрожжевых клеток появляется через часовой интервал, а у некоторых бактерий даже через каждые 20—40 мин. Однако обычно размножение происходит гораздо медленнее, так как в среде роста всегда есть ограничивающие (лимитирующие) факторы: нехватка какого-либо питательного вещества, изменение температуры, рН, образование токсических веществ, избыток клеточной массы на единицу объема и т. д.



Бактерии и дрожжи имеют следующие типы размножения:

1) деление, в результате которого выросшие клетки делятся на две части и образуются две клетки (чаще всего у бактерий);

2) почкование, начинающееся с появления небольшого выроста — почки на поверхности материнской клетки. Почка растет и затем отделяется в виде самостоятельной клетки, в которую переходит цитоплазма и часть ядра от материнской клетки. Этот вид размножения чаще всего встречается у дрожжей (рис. 26).

Плесени при прорастании образуют длинные, разветвленные нити — мицелий (см. приложение 4). При вегетативном размно-

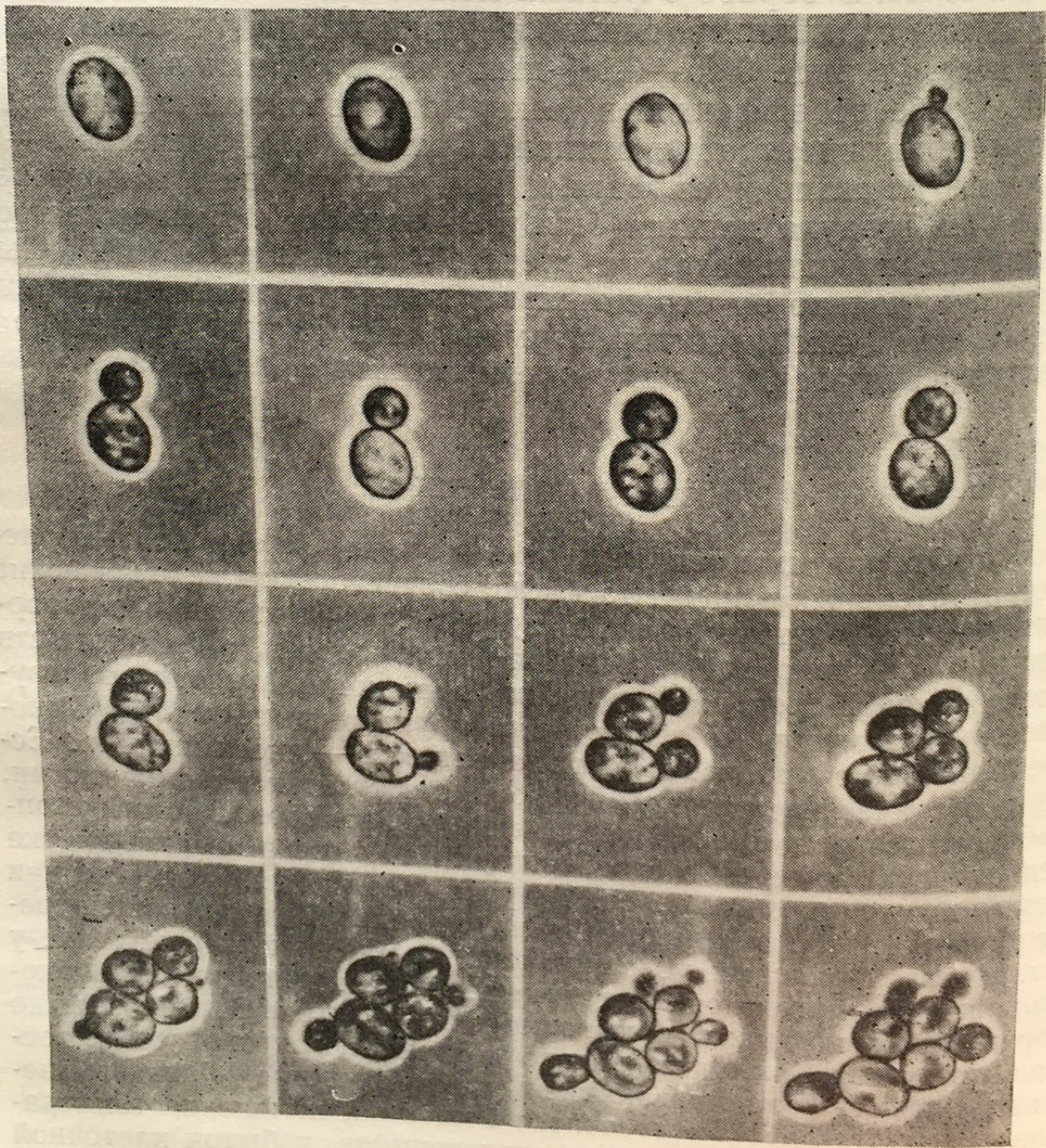


Рис. 26. Размножение дрожжей почкованием



жении мицелий распадается на отдельные участки, которые способны к самостоятельному развитию. Микроскопические грибы могут размножаться при помощи спор или конидий. Споры образуются как внутри вегетативной части гриба, так и снаружи на конце специальных выростов — стеригмов. Образование спор наблюдается также у дрожжей и некоторых видов бактерий.

Споры образуются при попадании клеток в среду с неблагоприятными условиями, где отсутствуют питательные вещества при наличии влаги и воздуха. В протоплазме клеток происходят следующие изменения: в отдельных местах клеточное вещество уплотняется, содержание влаги уменьшается до 45—55%, эти уплотнения отделяются от остальной части протоплазмы в виде шаровидных, овальных или включений другой формы. В клетках спорообразующих дрожжей величина спор достигает 2—6 мкм, а их число может быть 1, 2, 4, 8. Спорообразующие палочковидные бактерии называют бациллами. Кокки не образуют спор. Споры очень устойчивы к воздействию неблагоприятных температур, pH, радиации и других факторов. В сущности, образование спор — скорее способ сохранения существования, чем размножение.

В результате роста и размножения клеток в питательной среде увеличивается биомасса. Ее количество можно характеризовать по сухой массе клеток на единицу объема (мг/л, г/л кг/м<sup>3</sup>), в том случае если клетки имеют примерно одинаковые размеры — по числу клеток в единице объема (млн./мл, млрд./мл).

Рост и размножение культуры можно определить различными методами:

1) центрифугируя или фильтруя культуральную жидкость через мембранный фильтр и высушивая полученную пасту до постоянной массы;

2) нефелометрически, измеряя поглощение света клеточной суспензии, что пропорционально числу и размерам клеток;

3) определяя содержание азота в биомассе, полученной из определенного объема питательной среды;

4) по интенсивности выделения какого-либо вещества (газа, кислоты и др.).

Число клеток в питательной среде или культуральной жидкости определяют:

1) микроскопически, прямым подсчетом клеток, используя специальные камеры Тома, Горяева и др.;

2) по подсчету выросших колоний в чашках Петри;

3) по методу постепенного разбавления. При этом методе культуру постепенно разбавляют и определяют, при каком разбавлении не наблюдается ее роста.

В развитии микроорганизмов наблюдается несколько фаз (рис. 27). Посевной материал, попав в свежую полноценную сре-



ду, сразу не начинается размножения. Этот период называют *лаг-фазой I*. Только после определенного времени, иногда через несколько часов, клетки приспосабливаются к среде и окружающим условиям. В этот период активируются ферменты, а также, если это необходимо, синтезируются новые ферментные системы. В пе-

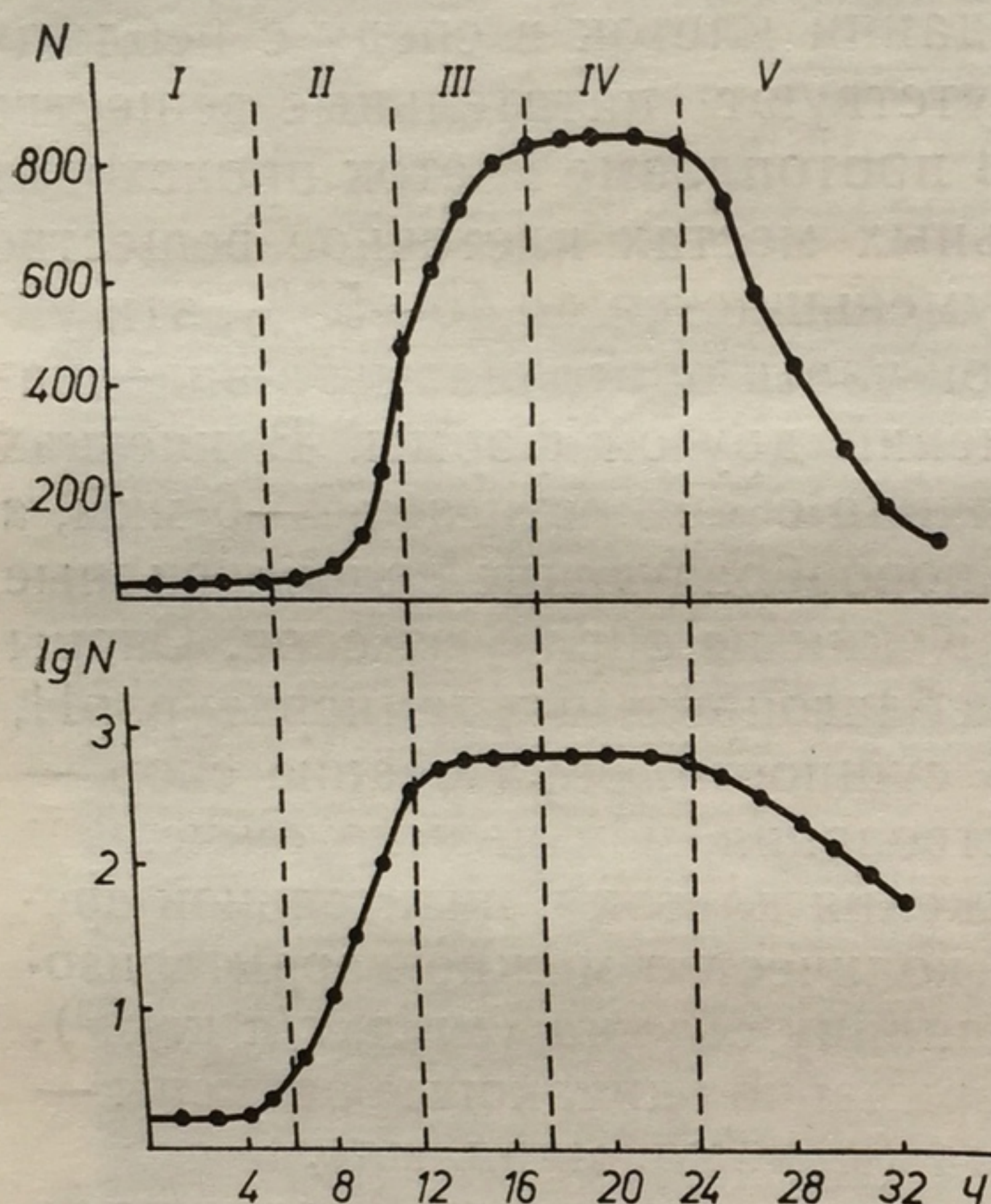


Рис. 27. Фазы роста культуры микроорганизмов:

*I* — лаг-фаза, *II* — логарифмическая фаза, *III* — фаза замедленного роста, *IV* — стационарная фаза, *V* — фаза отмирания,  $N$  — число клеток (млн/мл)

риод лаг-фазы стремительно возрастает количество нуклеиновых кислот, особенно РНК, что необходимо для биосинтеза белков. После лаг-фазы следует логарифмическая, или экспоненциальная, фаза *II*, в которой клетки размножаются с максимальной для данной культуры скоростью. Вследствие этого запас необходимых питательных веществ в среде уменьшается, кроме того, происходит накопление различных продуктов обмена веществ, которые в определенной концентрации могут мешать нормальному протеканию биохимических процессов обмена веществ. Иногда в питательной среде накапливается так много клеток, что не хватает пространства, а конкретнее, поверхности для новых поколений клеток. Именно через поверхность происходят процессы обмена — по-

падание питательных веществ в клетку и выведение метаболитов. Если клетка находится в тесном окружении других клеток, то площадь поверхности уменьшается и вместе с тем снижается интенсивность процессов обмена. Скорость роста культуры также уменьшается, если сокращается поверхность клеток на единицу объема. Это происходит при увеличении размеров клеток и, таким образом, особенно для клеток сферической формы, значительно ухудшаются условия питания.

Как известно, поверхность сферических тел изменяется пропорционально квадрату их радиуса, а объем — пропорционально кубу радиуса. Лимитирующие поверхности находятся, очевидно, и внутри клеток. В молекулярной биологии накапливается все больше фактов, которые указывают на то, что функционирование

жизненных процессов не  
мембранными структурами  
В ходе интенсивного влия  
системы негативное влия  
ется и в результате скоро  
замедленного роста *III*  
ной фазе *IV* масса клеток  
мального уровня. Затем н  
и автолизированных клет  
количество биомассы ум  
ния *V*.

Следовательно, наибо  
исходят в логарифмическ  
рующие факторы. Для х  
роорганизмов используют  
количество биомассы в ед  
роста в логарифмической  
относится к наиболее ва  
ских свойств. Абсолютны  
обычно за 1 ч, характе  
прирост биомассы за бес  
обозначить через  $dm$ , то

Чтобы определить, с  
от исходного количества  
среднюю скорость рост

Если прирост биом  
единице активной био  
значаемую  $\mu$  (или  $C$ ),

Среднюю удельную  
чений биомассы на  $m$

Если биомасса кул  
стоянной удельной с  
 $\mu_{cp} = \frac{\ln m}{t}$   
3-533



жизненных процессов необходимо связывать с биополимерами, мембранными структурами и их поверхностью.

В ходе интенсивного роста и размножения внутри закрытой системы негативное влияние лимитирующих факторов увеличивается и в результате скорость роста уменьшается, наступает *фаза замедленного роста III*. Через определенное время в *стационарной фазе IV* масса клеток в питательной среде достигает максимального уровня. Затем наступает период, когда число отмерших и автолизированных клеток превышает прирост. В результате количество биомассы уменьшается — наступает *фаза отмирания V*.

Следовательно, наиболее интенсивно рост и размножение происходят в логарифмической фазе, где еще не действуют лимитирующие факторы. Для характеристики развития культуры микроорганизмов используют скорость роста культуры — изменение количества биомассы в единицу времени. Максимальная скорость роста в логарифмической фазе различна для каждой культуры и относится к наиболее важной характеристике ее физиологических свойств. Абсолютный прирост биомассы в единицу времени, обычно за 1 ч, характеризует общая скорость  $v$  роста. Если прирост биомассы за бесконечно малый промежуток времени  $dt$  обозначить через  $dm$ , то

$$v = \frac{dm}{dt}.$$

Чтобы определить, с какой скоростью идет прирост биомассы от исходного количества  $m_0$  до  $m_1$  за время  $t_1 - t_0$ , используют среднюю скорость роста  $v_{\text{ср}}$ , которую определяют по формуле

$$v_{\text{ср}} = \frac{m_1 - m_0}{t_1 - t_0}$$

Если прирост биомассы в единицу времени отнести к одной единице активной биомассы, тогда скорость размножения, обозначаемую  $\mu$  (или  $C$ ), можно вычислить по формуле

$$\mu = \frac{v}{m} = \frac{dm}{dt} \cdot \frac{1}{m}.$$

Среднюю удельную скорость роста за период  $t_1 - t_0$  при увеличении биомассы на  $m_1 - m_0$  определяют по формуле

$$\mu_{\text{ср}} = \frac{\ln m_1 - \ln m_0}{t_1 - t_0} = \frac{2,3 (\log m_1 - \log m_0)}{t_1 - t_0}.$$

Если биомасса культуры микроорганизмов увеличивается с постоянной удельной скоростью роста, как это имеет место в логарифмической фазе, то



рифмической фазе развития, тогда количество полученной биомассы за период  $t_1 - t_0$  можно определить по формуле

$$m_1 = m_0 e^{\mu (t_1 - t_0)},$$

где  $e$  — основание натурального логарифма,

В солодовой среде (сусло) дрожжи имеют  $\mu = 0,19 \div 0,4$ , а кормовые дрожжи, выращиваемые на гидролизатах и отходах промышленности —  $\mu = 0,12 \div 0,17$ . При выращивании дрожжей в питательной среде за 1 ч на каждый 1 м<sup>3</sup> среды можно получить 1–3 кг сухой биомассы. Зная удельную скорость роста  $\mu$ , можно вычислить продолжительность генерации  $g$ , т. е. период удвоения количества биомассы. Эта величина обратно пропорциональная удельной скорости роста:

$$g = \frac{\ln 2}{\mu}.$$

Скорость прироста биомассы чаще всего интересует физиологов и технологов. Иногда важнее выяснить не закономерности прироста биомассы, а прирост числа клеток. В этом случае необходимо определить скорость их размножения. Если вначале число клеток равно  $N_0$  и после определенного времени — длительности генерации — оно удваивается, тогда через  $n$  генераций число клеток  $N_1$  равно

$$N_1 = N_0 \cdot 2^n.$$

Число генераций  $n$ , скорость размножения  $v$  и длительность генерации  $g$  можно определить по уравнениям:

$$\begin{aligned} n &= 3,32 (\log N_1 - \log N_0); \\ v &= \frac{n}{t_1 - t_0} = \frac{3,32 (\log N_1 - \log N_0)}{t_1 - t_0}; \\ g &= \frac{t_1 - t_0}{n} = \frac{1}{v} = \frac{0,3 (t_1 - t_0)}{\log N_1 - \log N_0}. \end{aligned}$$

Увеличение биомассы микроорганизмов важно и при получении биомассы, как таковой, и при накоплении в культуральной жидкости какого-либо вещества.

В первом случае процесс прекращают, когда достигнуто максимальное количество биомассы, когда максимально использован углерод и азот среды. Если источник углерода для образования биомассы и какого-либо продукта общий, например спиртовое брожение на сахарозе или мальтозе, тогда на определенном этапе увеличение биомассы ограничивают (при спиртовом брожении — путем образования факультативно анаэробных условий).



## МЕТОДЫ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ

В природе встречается множество микроорганизмов. Но в производстве для микробиологического получения различных веществ используют главным образом чистые культуры, т. е. однородные популяции микроорганизмов одного определенного вида и штамма. *Чистую культуру* обычно получают из одной изолированной клетки, которую потом постепенно размножают в стерильной среде. Эту работу проводят в стерильном боксе. Чистую культуру удобно изолировать, используя твердые среды Коха — агар, желатин и др. Если на поверхность твердой среды посеять достаточно разведенную суспензию микроорганизмов, то в благоприятных условиях вокруг каждой клетки культуры образуется островок однородных клеток — колония (см. приложения 6 и 7). Клетки из одной колонии при помощи петли или иглы в стерильных условиях переносят в стерильную среду, где они продолжают размножаться.

Для изолирования культур используют также метод Линднера. Согласно этому методу на покровное стекло кончиком пера наносят ряды капель культуры различного разведения и рассматривают в микроскоп каждую каплю. Каплю, где находится только одна клетка, с помощью кусочка стерильной фильтровальной бумаги переносят в стерильную среду. Отдельную клетку из препарата под микроскопом можно изолировать манипулятором.

Получая чистые культуры анаэробных микроорганизмов, работу проводят так, чтобы культура развивалась без доступа воздуха, например используют стеклянные трубочки — капилляры, пастеровские капиллярные пипетки и др.

В дальнейшем проводят определение всех морфологических и физиологических свойств изолированных культур и определяют их систематическое положение. Чистые культуры аэробных микроорганизмов чаще всего сохраняют в виде цепочки колоний, растущих на косом агаре. Пробирки с чистыми культурами хранят в холодильнике ( $0-4^{\circ}\text{C}$ ), не менее 2—4 раз в год и чаще культуры пересевают. Для каждой чистой культуры составляют паспорт, где подробно дается ее описание.

В институтах микробиологии и на микробиологических заводах создают коллекции чистых культур — музеи. Всесоюзная коллекция чистых культур микроорганизмов организована при Институте микробиологии АН СССР.

Коллекции промышленных культур микроорганизмов находят-ся при отраслевых (головных) институтах.

Используемые в промышленности культуры имеют большое значение, поэтому за выделение новых оригинальных культур — продуцентов различных веществ выдаются авторские свидетель-



ства и патенты. Выделить пригодную для промышленности культуру очень трудно. Обычно их ищут в местах, где протекают активные микробиологические процессы, — почве, иле, фекалиях. Японские ученые проверили около 300 000 культур, пока не выделили активные продуценты аминокислот. Для увеличения активности выделенных культур проводят селекционную работу или воздействуют на культуру ультрафиолетовыми лучами,  $\gamma$ -лучами или химическими веществами (иприт, этиленмин и др.), что вызывает мутации.

Для изучения физиологических свойств культуру выращивают в стерильной среде, наблюдают за ее ростом, следят за расходом питательных веществ и синтезом нужного продукта. Для выращивания аэробных микроорганизмов используют глубинный и поверхностный методы культивирования.

При выращивании микроорганизмов *глубинным методом* клетки суспендированы в жидкости и находятся во взвешенном состоянии. В небольшую (50—250 мл) колбу наливают жидкую питательную среду, в которую засевают чистую культуру либо с поверхности косого агара, либо из ампул. Затем колбу на сутки или более помещают в термостат с определенной температурой, где культура растет и размножается. Чисто аэробные микроорганизмы выращивают в специальных колбах, которые ставят на качалку в термокамере. После этого культуру пересевают в лабораторные ферментаторы со средой такого же или несколько измененного состава. Лабораторные ферментаторы — стеклянные аппараты емкостью 1—10 л, в которых можно обеспечить продувание среды воздухом, регулицию температуры, pH и других условий роста. По описанной выше схеме обычно организуют исследование культур микроорганизмов. Кроме того, таким путем готовят и чистую культуру для производственных нужд. Дальнейшее размножение чистой культуры в производственных условиях идет в несколько стадий при использовании металлических инокуляторов объемом от 0,1 до 100 м<sup>3</sup> и более. Инокуляторы снабжены мешалками, аэраторами, устройствами для стерилизации и охлаждения, арматурой, измерительными приборами. Для каждой следующей стадии необходимо 3—20% посевного материала (по объему).

Последнюю стадию, в которой получают нужный продукт, называют рабочей ферментацией. В культуральной жидкости, полученной после нее, суспендированы микробная биомасса, остатки питательной среды и экстрацеллюлярные метаболиты. Методами химической технологии из культуральной жидкости получают биомассу или нужное вещество — спирт, кислоту, аминокислоту, антибиотики и пр.

Аналогично выращиваются и анаэробные микроорганизмы,



только в этом случае через питательную среду не продувают воздух.

Используя *метод поверхностных культур*, микроорганизмы выращивают на твердых средах (влажные отруби и др.) или на жидких средах, залитых тонким слоем (2—20 см) в специальные кюветы. В этом случае биомасса располагается на поверхности среды. Чаще всего этим методом выращивают грибы, например культуры рода *Aspergillus*, используемые для получения лимонной кислоты и ферментов. Сначала размножают споры, которыми инфицируют стерильную среду. В камерах с кюветами поддерживают нужную температуру и обеспечивают аэрацию — циркуляцию воздуха между кюветами.

Культивирование микроорганизмов может быть непрерывным и периодическим. При *периодическом процессе* весь объем питательной среды загружают в аппарат сразу, добавляют посевной материал и при оптимальных условиях продолжают процесс до тех пор, пока не накопится нужное количество биомассы или определенного метаболита. В ходе периодического культивирования изменяется темп роста культуры, ее морфология и физиология. За время культивирования меняется состав среды — уменьшается концентрация питательных веществ, увеличивается содержание метаболитов. С физиологической точки зрения периодическое культивирование невыгодно. В ходе его возникает также ряд технологических трудностей — циклический ход операций, сменные режимы, что затрудняет контроль и регуляцию процесса.

Указанные недостатки устраняются при *непрерывном культивировании*, методы которого разработали С. В. Лебедев, А. А. Андреев, Н. Д. Иерусалимский и другие ученые. Из непрерывных процессов лучше всего разработан метод *глубинной ферментации*. В этом случае в ферментатор с культурой продуцента непрерывным потоком подается стерильная среда, а из него непрерывно вытекает готовая культуральная жидкость. Процесс может быть гомо- и гетерогенно непрерывным. При гомогенно непрерывном процессе в аппарате, где идет интенсивное перемешивание, все параметры (концентрация питательных веществ, клеточный титр и др.) постоянны во времени. При гетерогенно непрерывном процессе несколько ферментаторов соединены вместе и образуют каскад. Питательная среда поступает в первый ферментатор и готовая культуральная жидкость вытекает из последнего ферментатора. Культивирование микроорганизмов в протоке через систему трубок также идет по принципу гетерогенно непрерывного процесса ферментации. В этом случае имеет место непрерывный поток питательной среды, но клетки не обеспечены постоянными условиями роста (сколько аппаратов, столько и условий культивирования).



При непрерывном культивировании микроорганизмов необходимо отрегулировать такую скорость притока питательной среды и вытекания культуральной жидкости, чтобы предотвратить вымывание культуры из системы, т. е. концентрация клеток должна быть постоянной. В стерильных условиях непрерывный, или проточный, метод обеспечивает сохранение культуры в физиологически активном состоянии длительное время.

Скорость роста биомассы в потоке характеризует уравнение

$$\frac{dX}{dt} = (\mu - D) X,$$

где  $X$  — концентрация биомассы, г/л, мг/мл или число клеток в 1 мл;

$\mu$  — удельная скорость роста, ч<sup>-1</sup>;

$D$  — скорость разбавления культуры потоком среды, ч<sup>-1</sup>.

$$D = \frac{F}{V},$$

где  $F$  — скорость потока среды, мл/ч, м<sup>3</sup>/ч;

$V$  — объем аппарата, мл, м<sup>3</sup>.

Если  $\mu = D$ , то  $dX/dt = 0$ . Это значит, что концентрация клеток неизменна. Чаще всего это бывает при  $D = 0,05 \div 0,20$ .

Непрерывный процесс можно использовать в том случае, если культура при длительном выращивании не теряет способность к синтезу (мутации, реверсии) и если можно избежать инфицирования культуры. Разрабатывая метод непрерывного культивирования микроорганизма, необходимо установить:

- 1) оптимальный состав среды;
- 2) скорость потока среды;
- 3) температуру, pH, аэрацию и режим всех других условий.

В зависимости от метода, благодаря которому культура поддерживается в состоянии динамического равновесия (когда  $\mu = D$ ), различают турбидостатный и хеостатный принципы. По турбидостатному принципу скорость притока среды такова, что концентрация биомассы в системе постоянна, а по хеостатному принципу в системе поддерживается постоянная концентрация одного из компонентов среды (углерода, кислорода, соответствующего витамина и др.).

Зависимость удельной скорости роста культуры от концентрации субстрата можно определить по уравнению

$$\mu = \mu_{\text{макс}} \frac{S}{K_s + S},$$

где  $S$  — конечная концентрация субстрата, %;

$K_s$  — константа Михаэлиса, численно равная концентрации лимитирующего фактора  $S$ , при которой удельная скорость роста культуры равна половине максимальной удельной скорости роста.



Это уравнение, выведенное Моно, напоминает уравнение Михаэлиса — Ментена для ферментативных реакций. Это сходство не случайно, так как уравнение Михаэлиса — Ментена характеризует скорость отдельной ферментативной реакции, а скорость роста культуры зависит от скорости всех ферментативных реакций, идущих в клетке.  $K_S$  всегда больше нуля, т. е. величина положительная, но меньше единицы. В полноценной среде  $K_S$  по сравнению с  $S$  величина незначительная и ею можно пренебречь, тогда

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{S} = \mu_{\max}.$$

Следовательно, в полноценной среде скорость роста культуры не зависит от концентрации лимитирующего фактора (исключая те случаи, когда концентрация слишком мала).

Удельная скорость роста зависит от плотности популяции. При высокой концентрации клеток продукты обмена веществ могут задерживать рост, поэтому Н. Д. Иерусалимский для определения удельной скорости роста рекомендует уравнение

$$\mu = \mu_{\max} \frac{S}{R_S + S} \cdot \frac{K_P}{K_P + P},$$

где  $K_P$  — константа Иерусалимского, численно равная концентрации продукта, при которой удельная скорость роста равна половине скорости роста в среде без вредного продукта;

$P$  — концентрация продукта — метаболита, г/л.

Из уравнения видно, что увеличение концентрации метаболита  $P$  уменьшает удельную скорость роста. Это подтверждено на практике.

Изменение концентрации лимитирующего фактора в системе стабильного режима выражается уравнением

$$\frac{dS}{dt} = DS_0 - DS - \mu_{\max} \frac{X}{y} \left( \frac{S}{K_S + S} \right) = 0,$$

где  $y$  — экономический коэффициент (выход), т. е.  $dX/dS$  или  $dP/dS$ .

Следовательно,

$$(\text{изменение субстрата}) = (\text{приток}) - (\text{отток}) - \left( \frac{\text{использованный микроорганизмами субстрат}}{\text{субстрат}} \right)$$

Ранее было показано, что если система находится в равновесии,  $D = \mu$ . Его можно нарушить, изменяя скорость потока ( $D > \mu$  или  $D < \mu$ ) либо концентрацию субстрата среды  $S$ . В практике важно знать выход биомассы по субстрату, что характеризует экономический коэффициент



$$y = \frac{dX}{dS}.$$

Если режим установившийся,

$$X = y (S_0 - S) \text{ и } y = \frac{X}{S_0 - S},$$

где  $S_0$  — концентрация питательного вещества в среде;  
 $S$  — концентрация этого же вещества в культуральной жидкости;  
 $X$  — содержание биомассы в жидкости оттока, мг/мл, г/л.

Выход биомассы можно определить и в периодическом процессе, когда максимальное количество биомассы получают в стационарной фазе роста. Если количество этой биомассы обозначить  $M$ , а внесенного посевного материала —  $m_0$ , то экономический коэффициент, или средний выход, определяют по формуле

$$y_{\text{ср}} = \frac{M - m_0}{S_0 - S},$$

где  $S_0$  и  $S$  — концентрация субстрата в среде в начале и в конце культивирования.

Экономический коэффициент, который иногда называют *выходом биомассы*, имеет большое значение как для характеристики физиологических свойств культуры, так и в практическом получении биомассы или синтезе какого-либо продукта. Считают, что это в целом постоянная величина, на которую не влияют скорость разбавления (притока)  $D$  или концентрация лимитирующих веществ. Тем не менее, установлена некоторая зависимость экономического коэффициента  $y$  как от  $D$ , так и от концентрации субстрата, аэрации, интенсивности перемешивания и др.

Экономически значимым показателем является продуктивность системы  $DX$ , т. е. количество биомассы, полученное за единицу времени с единицы емкости ферментатора. При увеличении скорости разбавления  $D$  продуктивность системы возрастает. Она не зависит от концентрации клеток. Максимальную продуктивность в гомогенном непрерывном культивировании обычно получают при максимальной скорости разбавления. Однако при этих условиях не получают максимальный выход биомассы из использованного субстрата.

Если культуру микроорганизмов выращивают для получения какого-либо метаболита  $P$ , биосинтетическую активность культуры  $K$  определяют по формуле

$$K = \frac{dP}{dt} \cdot \frac{1}{X}.$$

Скорость биосинтеза определяют по формуле



$$\frac{dP}{dt} = KX.$$

Следовательно, скорость биосинтеза продукта прямо пропорциональна количеству биомассы и удельной биосинтетической активности  $K$  культуры.  $K$  можно определить через количество продукта  $P$ , полученного за время  $t_1 - t_0$ , по формуле

$$K = \frac{P}{(t_1 - t_0) m_{\text{ср}}}.$$

Если количество биомассы за этот период изменилось незначительно (прирост не превышает 2—3 раз), то  $m_{\text{ср}}$  можно определить как среднеарифметическое:

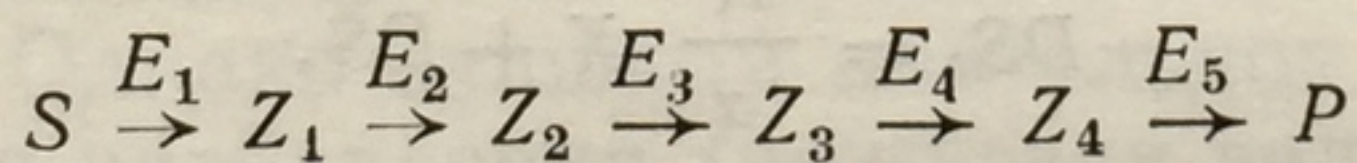
$$m_{\text{ср}} = \frac{m_1 + m_0}{2}.$$

Если прирост биомассы велик, как это бывает в логарифмической фазе роста, то

$$m_{\text{ср}} = \frac{m_1 - m_0}{2,3 (\log m_1 - \log m_0)}.$$

Удельная биосинтетическая активность культуры зависит от физиологических и даже генетических свойств культуры, т. е. от какого-то характеризующего культуру коэффициента, являющегося функцией внутренних и внешних факторов, влияющих на клетку  $i = f(A, B, C, \dots, Z)$ . Удельная биосинтетическая активность культуры зависит также и от скорости ферментативных реакций, лежащих в основе биосинтеза соответствующих продуктов.

Если количество продукта  $P$  образуется из субстрата  $S$  через пять ферментативных реакций, которые катализируют ферменты  $E_1, E_2, E_3, E_4, E_5$ , то скорость образования этого продукта зависит от скорости каждой отдельной реакции ( $E_1 - E_5$ ):



Если какая-нибудь реакция, например  $E_3$ , замедляется, то количество продукта  $Z_3$  уменьшается и это в свою очередь снижает скорость образования продукта  $P$ . Таким образом, скорость образования продукта  $P$  определяет скорость лимитирующей реакции, т. е.  $\lambda_{\text{лим}} = \lambda'$ . Зависимость скорости каждой такой ферментативной реакции от субстрата можно выразить уравнением Михаэлиса — Ментена, в данном случае:

$$\lambda' = \lambda_{\text{макс}} \frac{Z'}{K'_Z + Z'}.$$



где  $Z'$  — концентрация промежуточного продукта соответствующей реакции;  
 $K'_Z$  — константа Михаэлиса для данной реакции.

Из этого вытекает, что удельная биосинтетическая активность культуры зависит от обоих упомянутых коэффициентов —  $i$  и  $\lambda$ , т. е.

$$K = \lambda i.$$

Чтобы улучшить процесс получения продукта, важно установить лимитирующий участок биохимического процесса и исключить факторы, ограничивающие скорость этого участка (репрессоры, ингибиторы, температура, рН и др.).

В гомогенно непрерывном процессе, где  $D = \mu$ ,

$$K = \mu \frac{P}{X} = D \frac{P}{X},$$

$$P = \frac{KX}{D}.$$

Следовательно, количество получаемого продукта зависит не только от активности культуры и количества биомассы, но и от скорости разбавления  $D$ . Однако эта величина постоянна для каждого отдельного ферментатора и широко варьировать ее нельзя, поэтому продуктивность увеличивают, изменяя количество биомассы или биосинтетическую активность культуры.

Если накопление биомассы и образование продукта зависят от какого-то лимитирующего фактора, например от необходимых для роста дефицитных веществ (витамины, аминокислоты), можно изменять концентрацию этих веществ в питательной среде и в удаляемой из аппарата готовой культуральной жидкости.

В равновесном состоянии количество субстрата в поступающем питательном растворе одинаково с суммой его расхода и оттока, т. е.

$$DS_0 = \frac{K}{a} X + DS,$$

где  $a$  — выход биомассы из данного компонента.

Можно допустить, что этот выход не зависит от концентрации компонента. Концентрацию субстрата в вытекающей культуральной жидкости можно определить по формуле

$$S = S_0 - \frac{KX}{aD}.$$

Для установления концентрации субстрата в вытекающей культуральной жидкости необходимо учитывать его стоимость. Если данный компонент — ценное вещество, надо следить, чтобы его концентрация на выходе из системы была минимальной.



## Глава IV

# ОСНОВЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО ПРОИЗВОДСТВА

### СЫРЬЕ

Для приготовления питательных сред в микробиологической промышленности используют сырье минеральное, животного и растительного происхождения, а также синтезированное химическим путем. Эти вещества, входя в состав питательной среды, обеспечивают развитие культуры и биосинтез определенных продуктов. Они не должны содержать вредных примесей. При выборе сырья необходимо учитывать его влияние на себестоимость, так как в микробиологическом синтезе важное значение имеет стоимость исходных веществ и материалов. В качестве источников углерода чаще всего используют углеводы (глюкоза, сахароза, крахмал, лактоза) или богатые углеводами натуральные продукты (меласса, кукурузная мука, гидроль и др.), а также жиры и даже вещества, содержащие углеводороды (нефть, парафин, керосин, природный газ, метан и др.). Источником азота обычно бывают неорганические соли — сульфат аммония, двузамещенный фосфат аммония, аммиак, нитраты, а также мочевины или натуральные продукты — кукурузный экстракт, соевая мука, дрожжевой автолизат и т. д.

Если необходимо использовать сложные природные вещества или промышленные побочные продукты, они должны быть тщательно проверены биохимически на пригодность в качестве исходных веществ на лабораторных ферментационных стендах или в опытах на колбах. Жидкие виды сырья хранят в больших цистернах (рис. 28). Практика показала, что технологические свойства мелассы и кукурузного экстракта при хранении улучшаются в результате протекающих в них биохимических и микробиологических процессов. Однако слишком длительное хранение, особенно при возможности разбавления (дождевая вода, конденсат пара), ведет к порче исходных продуктов.

Ниже приводим характеристику некоторых основных видов сырья для микробиологического производства.

**Вода.** Для приготовления сред воду берут из водопровода, артезианских скважин или открытых водоемов после соответствующей обработки. Она должна быть биологически чистой (ГОСТ 2874—73), бесцветной, без привкуса и запаха, не должна давать осадка. Сухой остаток воды не должен превышать 1000 мг/л, общая жесткость не должна быть больше 7 мг-экв/л. Слишком жесткая вода замедляет рост микроорганизмов, так как растворен-



ные в ней вещества не учитываются в составе питательной среды для определенной культуры. Воздействие воды повышенной жесткости может быть и другим. Так, в дрожжевой промышленности при использовании воды из артезианских скважин получают хлебопекарные дрожжи более высокого качества, чем при использовании водопроводной воды.

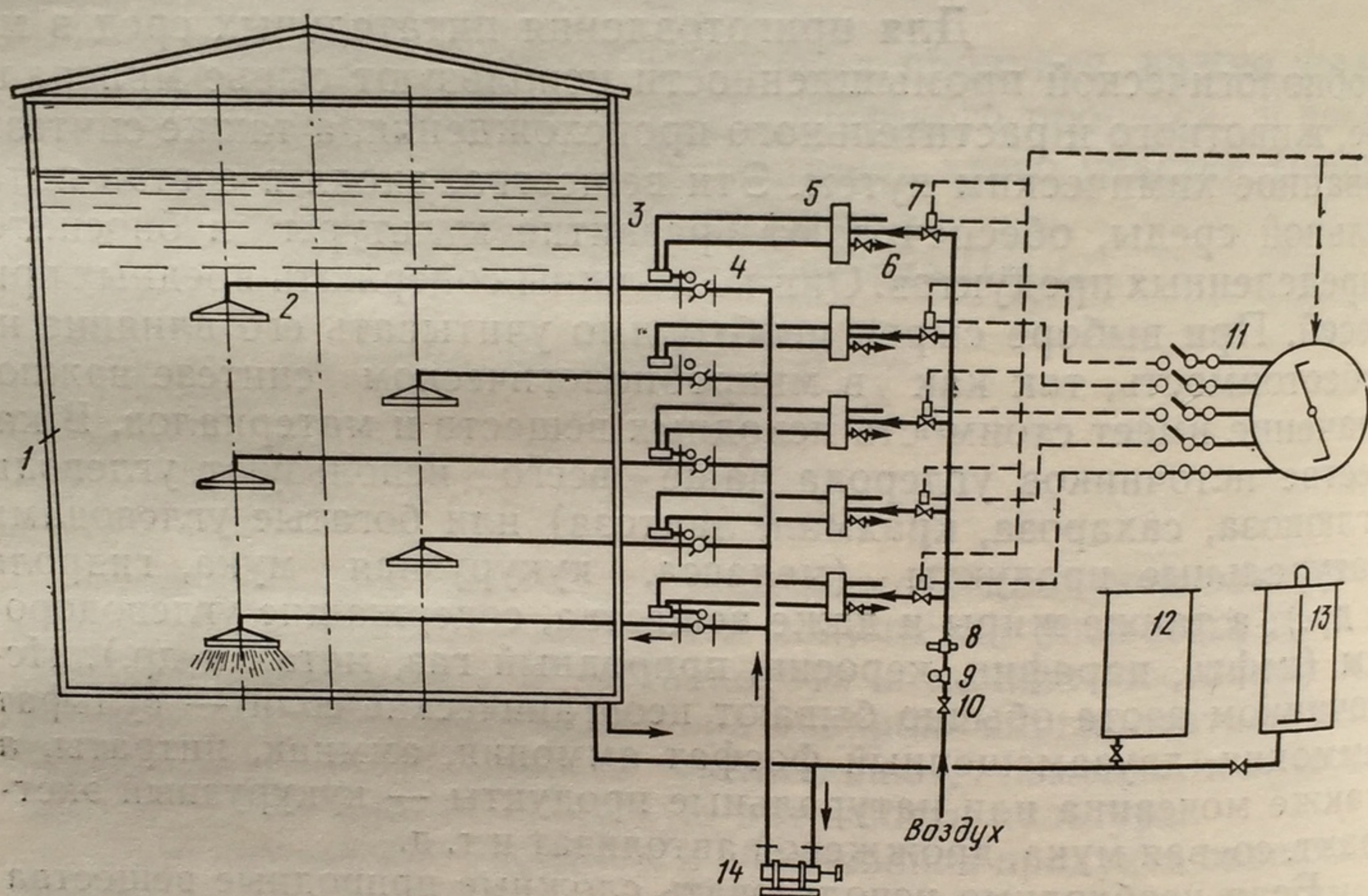


Рис. 28. Схема мелассного хранилища:

1 — резервуар, 2 — воронки для подачи мелассы, 3—11 — трубопроводы и арматура с регулирующими устройствами, 12 и 13 — сборники, 14 — насос

Повышенное осмотическое давление среды благоприятно для развития дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и задерживает рост диких штаммов дрожжей. Необходимо проверять химический состав воды. Нежелательно содержание гипса более 0,5 г/л и присутствие солей аммония, так как они свидетельствуют о том, что имеют место процессы гниения.

Содержание вредных веществ в воде не должно превышать следующих концентраций (в мг/л).

Свинец	0,1
Мышьяк	0,05
Фтор	1,5
Цинк	5,0
Медь	3,0



Общее число микроорганизмов в 1 мл воды не должно быть более 100. В микробиологической промышленности воду используют не только для приготовления сред, но и для мытья аппаратуры, систем охлаждения и т. д. В производстве хлебопекарных дрожжей на получение каждой тонны дрожжей используют 150—180 м<sup>3</sup> воды, на производство каждой тонны глутамата натрия — 900—1000 м<sup>3</sup> воды.

Эти примеры показывают, что в микробиологическом производстве большое значение имеет наличие чистой воды в большом количестве.

**Кристаллическая глюкоза** (ГОСТ 975—63). Этот продукт не должен содержать более 9% воды и свыше 0,07% зольных веществ, в том числе не более 0,004% железа. В сухом веществе должно быть не менее 99,5% редуцирующих веществ.

**Техническая сахароза** (ГОСТ 5833—54). Этот продукт содержит не менее 99,75% сахарозы, не более 0,03% зольных веществ, влажность до 0,15%.

**Техническая лактоза** (РТУ РСФСР 761—64). Получают лактозу из молочной сыворотки после выделения белков, сгущения до концентрации сахаров 50% и кристаллизации. Лактозный сахар-сырец содержит не менее 92% сахара, не более 3% воды, 2% зольных веществ и 1% молочной кислоты. Количество белка не регламентировано, но обычно оно не превышает 3%. Для нужд микробиологического синтеза иногда готовят сгущенный концентрат лактозы.

**Гидроль** (МРТУ 18-193—67). Представляет собой темный густой сироп с 50% сахара, главным образом в виде глюкозы. Содержит примерно 70% редуцирующих веществ по сухой массе. Примерно 18% сухого вещества гидроля составляют несбраживаемые сахара, а также органические кислоты. Количество зольных веществ не превышает 7%. Активная кислотность среды составляет примерно 4,0.

**Крахмал** (ГОСТ 10163—62). Влажность крахмала 20%. В зависимости от сорта (высший, I, II, III) содержание золы достигает 0,35—1,2% по сухой массе, а органических кислот 18—30 мл (по 0,1 н. NaOH). Крахмал не должен содержать хлора и свободных неорганических кислот, исключая сернистую кислоту, количество которой не должно превышать 5 мг/100 г продукта.

**Узкая фракция жидкого парафина для синтеза** (ТУ 38 101565—75). Жидкий парафин, очищенный от ароматических углеводородов, выделяют методом карбамидной депарафинизации или применяя цеолиты. Содержание нормальных алканов колеблется от 87 до 93%, плотность при 20°C не более 0,8 г/м<sup>3</sup>. Количество ароматических углеводородов допускается не более 0,5%, серы — не более 0,05%.



**Уксусная кислота** (ТУ 84-97—70). Является продуктом химического синтеза. В микробиологической промышленности может быть использована в качестве источника углерода. Содержание уксусной кислоты в продукте должно быть не ниже 60%, а формальдегида и муравьиной кислоты — не более 1%. Нелетучий остаток не должен превышать 0,1%.

**Спирт этиловый синтетический** (ГОСТ 11547—65). Получают гидратацией этилена. Технический спирт содержит не менее 92% об. этанола. Допускается присутствие изопропилового спирта до 0,21% об., сернистых соединений — до 2 мг/л, органических кислот (в пересчете на уксусную) — до 15 мг/л, сложных эфиров (в пересчете на уксусноэтиловый) — до 1% об., сухого остатка — до 10 мг/л, диэтилового эфира — до 1% об., нерастворимых в воде веществ — до 0,15%. В качестве источника углерода в микробиологической промышленности используют также гидролизный и пищевой этиловые спирты, в том числе этиловый спирт-сырец (ГОСТ 131—67), спирт-ректификат (ГОСТ 5962—67) и спирт этиловый ректифицированный технический (ГОСТ 18300—72).

**Меласса.** Представляет собой нестандартный побочный продукт сахарной промышленности. Остается после второго отделения кристаллов сахара. Цвет темно-коричневый, плотностью 1,35—1,40. Меласса содержит 61—86% сухих веществ, 40—55% сахарозы. Кроме того, в ней имеется от 0,5 до 2% инвертного сахара и 0,5—2,5% раффинозы. 1,1—1,5% мелассы составляет азот, причем третья часть его находится в форме бетаина, использовать который в качестве источника азота микроорганизмы, как правило, не могут. В состав мелассы входят многие аминокислоты, например аспарагиновая, глутаминовая, лейцин, изолейцин, тирозин, а также витамины группы В — биотин, тиамин, рибофлавин, инозит, никотиновая и пантотеновая кислоты, из которых особенно большое значение в микробиологическом синтезе имеет биотин (табл. 7).

подавляющее большинство меласс нашей страны содержит не более 70—80 мг/т биотина.

Таблица 7. Содержание ростовых веществ в мелассе (в мг/т)

Ростовые вещества	Меласса		Необходимое количество	
	свеклосахарная	тростниковая	для оптимального выхода дрожжей	для 115%-ного выхода дрожжей
Биотин	40—130	2700—3200	250	290
Пантотеновая кислота	50000—110000	50000—60000	44000	50000
Инозит	5700000—8000000	6000000	1000000	1200000

В мелассной жидкости (до 4,5%), кальция (до 0,5%), тельно мало фосфора. Некоторые показатели в табл. 8.

Таблица 8. Химический состав мелассы

Показатели
Сухие вещества
Сахароза
Инвертный сахар
Раффиноза
Сумма сбраживаемых сахаров
Доброкачественность
Зола (за вычетом кальциевой)
K <sub>2</sub> O
MgO
CaO
Азот
общий
аминный (до гидролиза)
аминный (после гидролиза)
Летучие кислоты
SO <sub>2</sub>
Буферная емкость (до pH 4,5), расход H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , мл/100 г
Цветность, мл раствора пода
0,1 н

При хранении мелассы могут иметь низкие температуры. Мелассы могут находиться в жидком состоянии до 0,25—0,4% воды или конденсатом до 50000 в 1 г. Мелассная барда хранится до 1,3% в месяц. Химический состав мелассы.



В мелассной золе много калия (30—40%), магния (1,5—4,5%), кальция (до 14%), железа и других элементов, но сравнительно мало фосфора.

Некоторые показатели свеклосахарной мелассы представлены в табл. 8.

Таблица 8. Химический состав свеклосахарной мелассы

Показатели	Содержание, % к массе			
	минимальное	максимальное	среднее	оптимальное для производства дрожжей
Сухие вещества	61	86	75—77	—
Сахароза	40,0	55,0	45,0	—
Инвертный сахар	0,1	10,0	0,5—1,2	—
Раффиноза	—	2,5	0,5—1,0	—
Сумма сбраживаемых сахаров	43,0	57,0	46,0—48,0	Не более 50
Доброкачественность	56,0	75,0	62—65	» » 65
Зола (за вычетом кальциевой)	4,0	10,0	6,6—7,5	Не менее 7
K <sub>2</sub> O	1,0	5,5	2,5—3,5	» » 3,5
MgO	0,001	1,0	0,1—0,24	—
CaO	0,1	2,0	0,5—0,8	Не более 1,0
Азот				
общий	0,5	2,3	1,1—1,5	Не менее 1,4
аминный (до гидролиза)	0,1	0,5	0,2—0,35	—
аминный (после гидролиза)	0,3	0,8	0,5—0,6	Не менее 0,35
Летучие кислоты	0,3	1,8	0,5—1,0	Не более 1,2
SO <sub>2</sub>	0,01	0,05	0,03	» » 0,05
Буферная емкость (до pH 4,5), расход H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , мл/100 г	14	40	22—27	30—40
Цветность, мл 0,1 н раствора иода	0,4	12,0	2,2—3,2	1—2

При хранении мелассы в результате деятельности микроорганизмов могут иметь место потери сахаров. Если в каждом грамме мелассы находится не более 15000 микроорганизмов, потери не превышают 0,25—0,45% в месяц. При разбавлении мелассы водой или конденсатом пара число микроорганизмов может увеличиться до 50000 в 1 г мелассы и тогда потери сахаров увеличиваются до 1,3% в месяц.

**Мелассная барда.** Является отходом спиртового завода. Содержание сухих веществ в натуральной барде 6—10%. Средний химический состав мелассной барды представлен в табл. 9.



Таблица 9. Средний химический состав мелассной барды

Компоненты	Барда	
	несепариро- ванная	сепарирован- ная
Вода, %	90—92	90—92,5
Сухие вещества, %	10—8	10—7,5
Содержание в 100 г сухих веществ, органических веществ, г	67,0—72,0	66,5—72,0
В том числе:		
дрожжевой массы	4,0—6,5	—
органического азота, входящего в состав дрожжей, бетаина и аминокислот бетаина	3,0—6,0	2,8—5,0
летучих кислот (муравьиная и уксусная)	8,0—17,0	8,1—17,0
глутаминовой кислоты	1,0—1,5	1,0—1,5
прочих аминокислот	6,0—13,0	6,0—13,0
органических кислот (гликолевая, молочная, янтарная)	3,0—6,0	3,0—6,0
глицерина	1,5—2,0	1,5—2,0
Минеральный состав, %	8,0—9,0	8,0—9,0
$K_2O$	18,5—20,0	18,5—20,3
$Na_2O$	7,5—8,0	7,5—8,1
$CaO$	0,5—3,0	0,5—3,1
Микроэлементы, %	1,5—2,0	1,5—2,0

Кроме указанных элементов, в 1 кг барды содержится 6,5 мг марганца, 0,65 мг кобальта, 2,2 мг меди, а также ряд витаминов группы В.

**Ацетонобутиловая барда.** Является отходом производства органических растворителей. Состав ее представлен в табл. 10.

Таблица 10. Состав ацетонобутиловой барды (в %)

Компоненты	Барда	Сухие веще- ства барды
Сухие вещества	2,51	100,0
в том числе нерастворимые	1,15—1,50	—
Углеводы в пересчете на глюкозу (после гидро- лиза)	0,72—0,96	32,6—38,2
Азотсодержащие вещества	0,89—1,0	35,6—47,7
в том числе растворимые	0,70—0,96	35—39
Клетчатка	0,08—0,28	3,1—7,6
Зольные вещества	0,11—0,14	4,3—6,3
Прочие экстрактивные вещества (в том числе жир)	0,12—0,47	5,4—18,75
Растворители (бутанол), г/л	0,07—0,3	—



Для микробиологических нужд барду используют после декантации и отделения шлама (15—20% от массы барды).

**Кукурузный экстракт** (МРТУ 18-241—68). Представляет собой густую жидкость коричневого цвета. Химический состав экстракта зависит как от сорта кукурузы, так и от условий ее выращивания, а также от технологии получения и условий хранения экстракта. Ниже приведен состав кукурузного экстракта.

	Содержание, %
Вода	30—60
Общий азот	2,7—4,5
Аминный азот	1,0—2,0
Редуцирующие сахара	0,1—11,0
Молочная кислота	5,0—11,5
Летучие кислоты	0,1—0,5
Ангидрид сернистой кислоты	0,01—0,02
Зольные вещества	8,0—10,0
Кальций	0,25—0,75
Медь	≤0,001
Железо	0,01—0,03
Магний	0,25—0,50
Марганец	0,02—0,06
Сера	0,15—0,20
Цинк	0,003—0,005
Калий	0,5—1,0

Так как во время замочки происходит частичный ферментативный гидролиз белков, в составе экстракта имеется много аминокислот. В период замочки идет также молочнокислое брожение, поэтому в кукурузном экстракте может быть до 11,5% молочной кислоты. Количество зольных веществ в экстракте не должно превышать 24%, причем в золе преобладает фосфор, калий и магний. Кукурузный экстракт можно использовать как источник витаминов группы В, особенно биотина (150—200 мкг/100 г) и различных биостимуляторов. Количество ангидрида сернистой кислоты не должно превышать 0,5%. Кукурузный экстракт обычно сильно инфицирован микрофлорой, поэтому надо следить, чтобы это не стало источником инфекции при производстве.

Близок по составу к кукурузному экстракту пшеничный экстракт, который получают путем замачивания зерен пшеницы.

Для культивирования некоторых микроорганизмов кукурузный экстракт можно заменить также клеточным соком картофеля. Концентрат его получают при производстве крахмала, выделяя из массы растертого картофеля сок и сгущая его в вакуум-аппаратах до содержания сухих веществ 30—40%.



**Молочная сыворотка.** Является побочным продуктом при производстве сыра, казеина и творога. Ниже приведен средний состав молочной сыворотки.

Содержание, %	
сухие вещества	5,3—6,5
белок	0,5—1,0
жир	0,05—0,4
молочный сахар	4,0—4,8
зола	0,5—0,7
Содержание, мкг/кг	
аскорбиновая кислота	4,7
тиамин	0,37—0,45
рибофлавин	1,8—2,5
пиридоксин	1,2—1,5
фолиевая кислота	0,2—0,8
никотиновая кислота	1,0—1,7
парааминобензойная кислота	0,1
пантотеновая кислота	2,9—4,4
холин	165,0—400,0
биотин	0,01—0,04
цианкобаламин	0,1—2,9
ретинол	0,02—0,04
токоферол	0,20—0,29

**Водная вытяжка солодовых ростков.** Является богатым источником витаминов группы В (содержание биотина составляет 128 мг/т сухих ростков) и аминокислот. При соотношении измельченных солодовых ростков и воды 1 : 10 после 2-часовой выдержки при 50°C в фильтрате содержится около 4% сухих веществ, причем концентрация сахара составляет 1,9%, а водорастворимого азота — 2,3% сухого вещества. Для использования в промышленности выпускают концентрат вытяжки, упаренный до 50%-ного содержания сухих веществ.

**Кукурузная мука** (ГОСТ 14176—69). Содержит 67—70% крахмала и примерно 10% других углеводов, главным образом целлюлозу, пентозаны, декстрины и растворимые углеводы. Белки составляют примерно 12%, из которых 30% приходится на глютелин и 50% — на зеин. Количество зольных веществ примерно 0,92%, из которых 45% составляет ангидрид фосфорной кислоты, 30% — окись калия, 15% — окись магния. Влажность не должна превышать 15%. Кукурузная мука является самым дешевым продуктом из всех зерновых и ее цена зависит от степени измельчения (помола).

**Соевая мука** (ГОСТ 3898—56). Получают размалыванием соевых бобов или жмыха после отделения масла. Поэтому разли-



чают содержащую и не содержащую масло соевую муку. Соевая мука может быть пропаренная (дезодорированная) или непропаренная. Последнюю можно хранить только 2—3 мес, а пропаренную — до года. Содержание влаги в муке 9—10%. Наиболее ценный компонент соевой муки — азотсодержащие вещества, главным образом белки (глицинин). В белке 20% глутаминовой кислоты. Содержание углеводов в соевой муке не превышает 25%. Количество зольных веществ 4,5—6,5%. В соевой муке содержится много лецитина, что определяет ее эмульгирующие свойства, много ферментов и витаминов группы В.

**Сапропели и их гидролизаты.** Являются источником ряда биологически активных веществ органической и минеральной природы. Сапропель, или озерный ил, образуется из остатков растительных и животных организмов, обитающих в пресных озерах. После их оседания в результате микробиологических процессов органическое вещество сапропелевых отложений постепенно разлагается—минерализуется. Сапропелевые отложения можно найти в озерах на глубине 2—5 м в виде студнеобразного слоя разной плотности с содержанием воды 85—80%. По цвету сапропель бывает зеленоватым, оливковым, бурым или серым. В озерах СССР его не менее 41 млрд. м<sup>3</sup>. Состав сапропеля сильно меняется в зависимости от месторождения, глубины слоя и др. В зависимости от степени минерализации золы содержится от 5 до 80% в пересчете на сухое вещество. В золе сапропеля 60—80% SiO<sub>2</sub>; 4,5—14,4% Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 12,2—17,1% Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>; 4,6—20,9% CaO; 0,7—2,5% MgO. Весьма богат спектр микроэлементов.

Органическое вещество в сапропеле малой степени разложения составляет больше половины сухой массы — до 68%, а в минерализованном — 35—40%. Содержание белковых веществ составляет 10—18% в пересчете на сухое вещество, жиров 0,3—0,5%, клетчатки 1—6%, целлюлозы 10—50%. Характерной особенностью химического состава органической массы сапропеля является содержание до 17—60% гуминовых и фульвокислот и битумов (7—15%). Сапропель является хорошим источником витаминов. Вытяжка или гидролизаты сапропеля заменяют кукурузный экстракт при биосинтезе. Кроме того, как известно, сапропель — лечебная грязь, кормовая добавка и хорошее удобрение для почвы.

**Серная кислота** (ГОСТ 2184—67 и ГОСТ 667—53). Широко применяется для подкисления среды. Чаще всего используют техническую серную кислоту, содержащую 92,5—94% моногидрата. Количество мышьяка не должно превышать 0,0001%.

**Ортофосфорная кислота** (ГОСТ 10678—69). Используется как источник фосфора и как средство подкисления среды. Содержит 50,7% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Мышьяка не должно быть более 0,0003%.



**Соляная кислота** (ГОСТ 857—69). В дрожжевом производстве применяется соляная кислота, исходная концентрация которой не менее 31 %.

**Карбамид, или мочеви́на** (ГОСТ 2081—69). Содержит 46,3% азота. Необходимо учитывать, что при термической стерилизации карбамид разрушается. Иногда используют стерильные спиртовые растворы карбамида.

**Сульфат аммония** (ГОСТ 9097—65). Эта соль хорошо растворяется в воде. Применяется как источник азота для культивирования многих микроорганизмов, так как содержит 20% азота. Количество свободной серной кислоты 0,05—0,2%. В сульфате аммония не должны присутствовать завышенные количества фенола и пирокатехина.

**Диаммонийфосфат** (ГОСТ 8515—57). Хорошо растворяется в воде. Используется как источник азота и фосфора. Содержит 48—50% фосфорнокислого ангидрида и 21—22% аммиака. Количество мышьяка не должно превышать 0,005%, фтора — 0,3%.

**Хлористый калий** (ГОСТ 4568—65). Хорошо растворяется в воде. Является экономически выгодным источником калия (содержание KCl 92—99% в зависимости от сорта). Количество примесей не должно превышать 2%, в том числе хлорида натрия — не более 1,4%.

**Калий углекислый кальцинированный** (ГОСТ 10690—63) содержит основного вещества 97,5—98% — I сорт и 92,5—93% — II сорт. Соль очень гигроскопична.

**Сульфат магния**. Представляет собой бесцветные кристаллы. Насыщенный раствор кипит при 108°C и содержит 75 г вещества на 100 г воды. В природе соль встречается в виде минералов: кизерита и эспомита. Бесцветные кристаллы кизерита ( $MgSO_4 \cdot H_2O$ ) в воде даже при нагревании растворяются медленно. Прозрачные кристаллы эспомита ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ) хорошо растворяются в ней.

**Сода каустическая** (ГОСТ 2263—59). Применяется для мойки аппаратуры и подщелачивания среды. Твердая каустическая сода должна содержать не менее 92—96% едкого натра, жидкая — не менее 42—50%.

**Сода кальцинированная** (карбонат натрия, или углекислый натрий). Применяется для мойки аппаратуры и подщелачивания среды. В микробиологическом производстве используется синтетическая сода (ГОСТ 5100—64), содержащая 96,8% химически чистого вещества.

**Олеиновая кислота**. Применяется в качестве пеногасителя. Получают олеиновую кислоту гидролизным расщеплением жиров и масел. Технический олеин (ГОСТ 7580—55) представляет собой смесь непредельных жирных кислот в количестве 95% для марок



А и Б и 92% — для марки В. Температура кипения  $360^{\circ}\text{C}$ , плавления — не выше  $10^{\circ}\text{C}$ . В качестве пеногасителей используют также растительные масла, жиры и синтетические пеногасители.

**Синтетические пеногасители.** К ним относятся такие поверхностно-активные вещества, как кремнийорганические полимеры (силоксаны), четырехзамещенные аммониевые основания, алкиламиносульфаты, сложные эфиры, спирты и др. В СССР освоено производство синтетического пеногасителя марки ПМС-154А. Расход синтетических пеногасителей в десятки раз ниже натуральных.

**Жир кашалотовый** (ГОСТ 1304—60). Используется в качестве пеногасителя в процессе ферментации. При комнатной температуре расслаивается на осадок и жидкую фазу. Плотность жира 0,87—0,90, число омыления 3—20 (в зависимости от сорта). Содержит примерно 12% насыщенных и 37% ненасыщенных жирных кислот.

Так как в клетках многих микроорганизмов имеется липаза, которая катализирует расщепление жиров на глицерин и жирные кислоты, пеногасители можно применять и как источник углерода.

**Мел** (ГОСТ 8253—56). Мел обычно используется для стабилизации рН среды в процессе ферментации, если образуются кислоты. Для этих целей пригоден как химически осажденный из известкового молока пропусканием углекислого газа, так и природный размельченный мел. Мел должен быть в виде белого, мелкого, сыпучего порошка с содержанием влаги 1—2%, карбонатов кальция и магния — 96—98%. Количество соляной кислоты в нерастворимой части не должно превышать 5%. На процесс биосинтеза могут влиять такие примеси в меле, как магний, алюминий, железо, марганец и др.

**Аммиак или аммиачная вода.** Используется как источник азота и регулятор рН среды. Аммиак I сорта содержит не менее 25%, а аммиак II сорта — не менее 20% азота.

**Формалин.** Применяется в виде 37—37,3%-ного раствора формальдегида. Содержит 6—6,5% метилового спирта и 0,02—0,04% муравьиной кислоты. Используется как дезинфицирующее вещество.

**Антиформин.** Представляет собой комбинированное дезинфицирующее средство, содержит в 1 м<sup>3</sup> раствора 100 кг хлорной извести, 75 кг кальцинированной соды и 10 кг каустической соды. Раствор хлорной извести (100 кг на 400 л воды) при  $60^{\circ}\text{C}$  вливают в раствор кальцинированной соды (75 кг на 500 л воды) и к этой смеси добавляют раствор каустической соды (10 кг на 75 л воды). Смесь отстаивают 12—24 ч и перед употреблением разводят водой в соотношении 1 : 30.



**Четвертичные аммонийные соединения.** Применяются в небольших дозах (0,001—0,005%) для антисептирования сырья, например мелассы. Эти соединения не токсичны для человека, поэтому, например, катапин-П используют для дезинфекции пивоваренного и других видов пищевого оборудования.

## ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОРУДОВАНИЕ

Для приготовления питательных сред определенной рецептуры используют химические промышленные реакторы с мешалками. Материал, из которого сделан реактор, должен соответствовать химическим свойствам смешиваемых компонентов. Чаще всего применяют аппаратуру, трубопроводы и арматуру из нержавеющей стали.

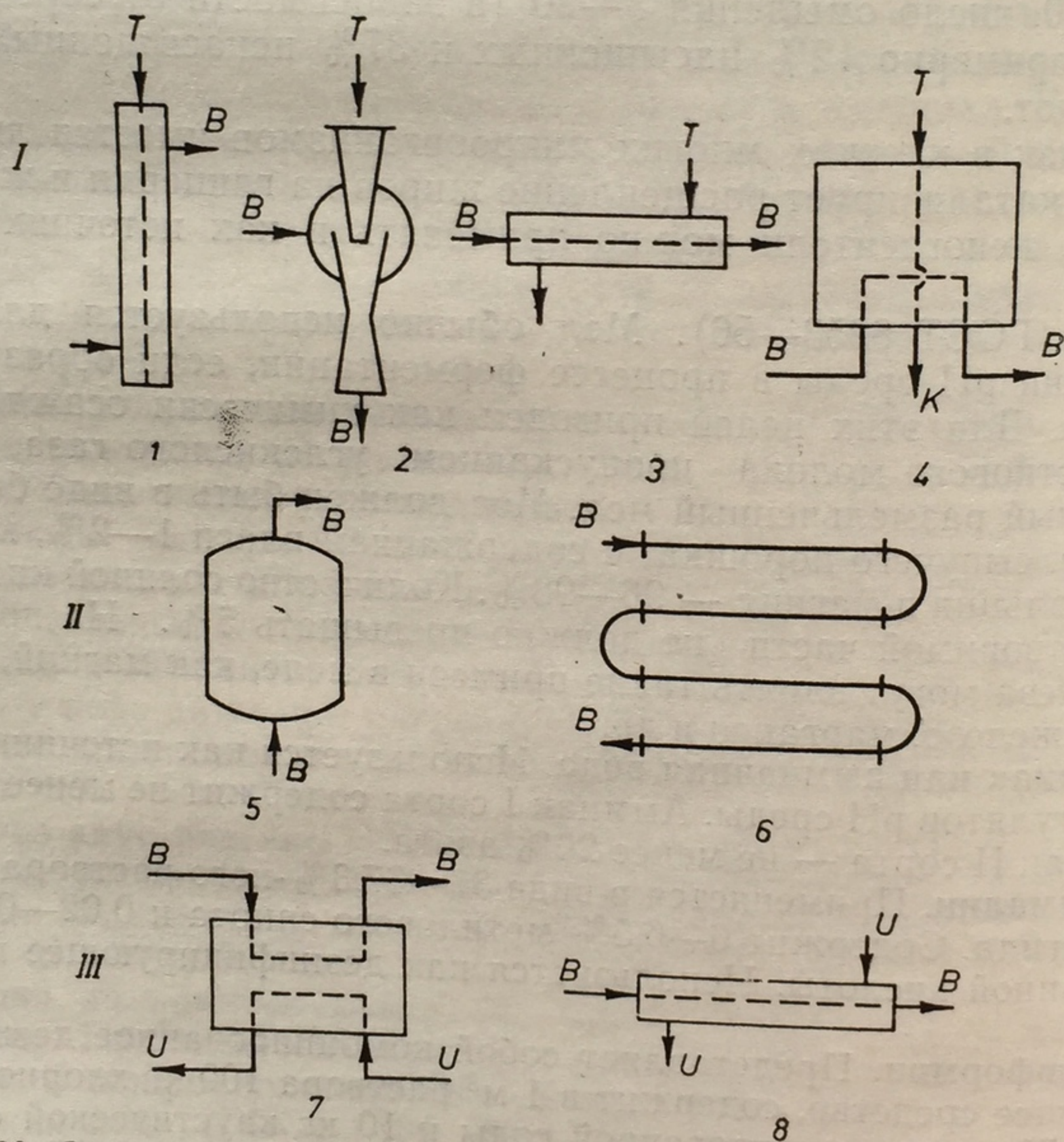


Рис. 29. Схемы типовых устройств, используемых для непрерывной стерилизации среды:

I — секция нагрева, II — секция выдерживания (стерилизации), III — секция охлаждения; В — питательная среда, Т — пар, К — конденсат, У — вода; 1 — колонна, 2 — паровой инжектор, 3 и 8 — теплообменники в виде двойных трубок, 4 и 7 — теплообменники пластинчатого типа, 5 — выдерживатель цилиндрического типа, 6 — трубчатый теплообменник.



веющей стали. Необходимо тщательно выбрать и изготовить устройства для стерилизации питательных сред. Наиболее широко распространенные типы устройств представлены на рис. 29.

В секции нагревания среды можно использовать колонны, паровые инжекторы или сдвоенные трубы (труба в трубе), а также теплообменники пластинчатого типа. В установленную вертикально колонну питательную среду подводят снизу в пространство между трубами (рис. 30). В верхнюю часть колонны через вертикальный барботер с отверстиями подают пар под давлением 0,3—0,4 МПа (3—4 кгс/см<sup>2</sup>). Скорость потока среды необходимо выбрать такой, чтобы каждая элементарная частица питательной среды находилась в зоне прогрева 10—15 с. Чтобы уменьшить шум, образующийся при конденсации пара в холодной питательной среде, желательно предварительно уже в реакторе нагреть среду до 70—80°C. В этих условиях улучшается процесс полного растворения компонентов среды. Для задержки нерастворимых частиц между насосами и колонной нагрева помещают сетчатый фильтр.

В эксплуатации очень удачны нагреватели типа инжекторов. Они бесшумны в работе, исключают возможность засорения поверхности и отверстий компонентами среды, как это имеет место в колонных барботерах или поверхностных теплообменниках пластинчатого типа и типа сдвоенных труб.

Секция выдерживания питательной среды может быть либо в виде герметических резервуаров, либо в виде системы трубопроводов. Длительность выдерживания каждой элементарной частицы среды в системе должна

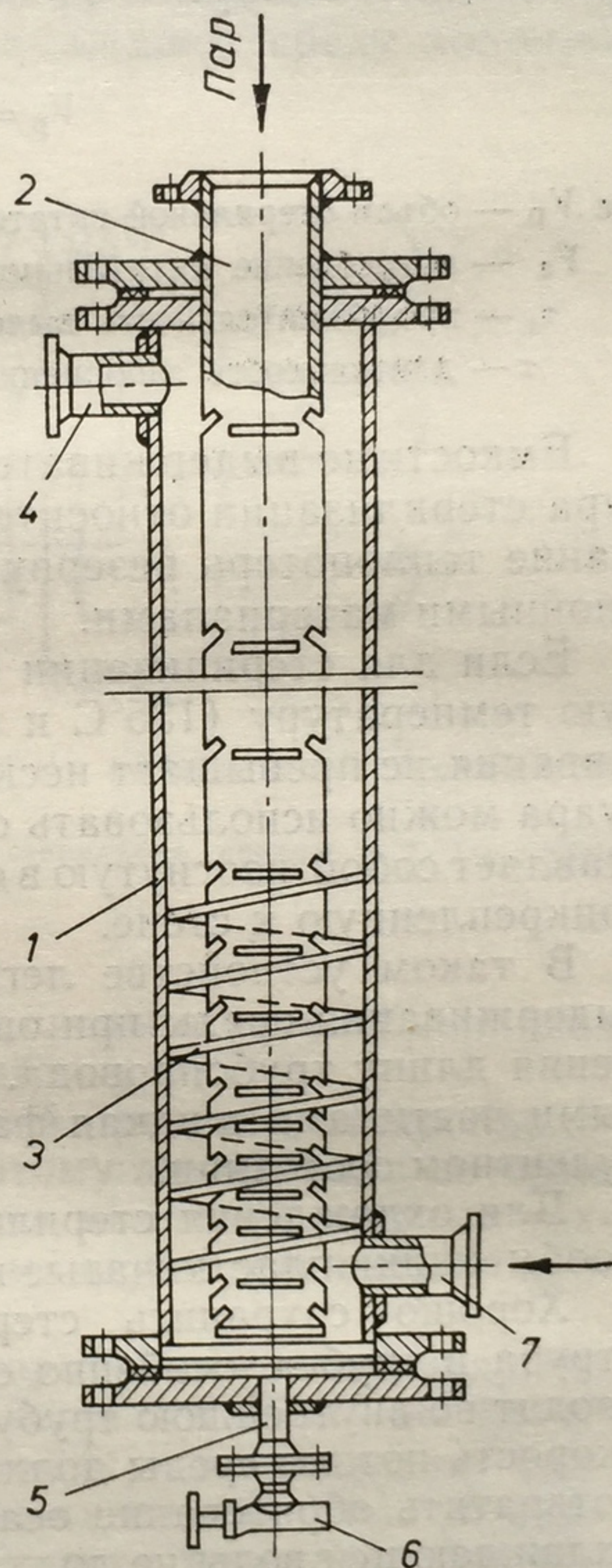


Рис. 30. Схема колонны для стерилизации питательной среды:

1 — корпус, 2 — внутренняя труба, 3 — червяк, 4 — трубка для вывода питательной среды, 5 — нижняя выводная трубка, 6 — вентиль, 7 — трубка для ввода питательной среды



быть определенной и гарантировать инактивацию как вегетативных клеток, так и спор. Это означает, что аппарат должен обеспечить так называемое полное вытеснение, которое достигается при установлении постоянной скорости перемещения питательной среды.

Зная необходимую продолжительность выдерживания, рабочую емкость аппарата  $V_p$  определяют по уравнению

$$V_p = V_c \tau_1 = V \frac{\tau_1}{\tau},$$

где  $V_p$  — объем стерильной питательной среды, заполняющей ферментатор, м<sup>3</sup>

$V_c$  — потребление питательной среды в системе,  $\text{м}^3/\text{с}$ ;

$\tau_1$  — продолжительность выдерживания, с;

$\tau$  — длительность заполнения ферментатора, с.

Емкостные выдерживатели обычно используют, если температура стерилизации относительно низкая или умеренная. Во избежание теплотерь резервуары снаружи покрывают теплоизоляционными материалами.

Если для стерилизации среды применяют относительно высокую температуру ( $135^{\circ}\text{C}$  и выше) и определенный объем выдерживания не превышает несколько десятков литров, вместо резервуара можно использовать систему трубок, которая обычно представляет собой изогнутую в одной плоскости систему, вертикально прикрепленную к стене.

В таком устройстве легко регулировать продолжительность выдерживания среды при определенной скорости протекания, изменяя длину трубопровода. Для улучшения теплообмена с твердыми частицами жидкая фаза среды должна находиться в турбулентном состоянии.

Для охлаждения стерильной среды можно использовать теплообменники пластинчатые или типа «труба в трубе».

Хорошо сохранить стерильность позволяют аппараты типа «труба в трубе», особенно если стерильно изолированную среду вводят во внутреннюю трубу. Во избежание образования осадков скорость потока среды должна быть примерно 2 м/с. Чтобы предотвратить образование осадков на стенках труб, температура охлаждающей воды не должна быть выше 50°C. Недостатком холодильников типа «труба в трубе» является трудность механической очистки их внутренней поверхности. Кроме того, у таких аппаратов большие размеры и, следовательно, они требуют большого расхода металла.

Теплообменники пластинчатого типа компактны и обладают высокоэффективным теплообменом, их широко используют при пастеризации молока. Эти аппараты хорошо герметизированы и

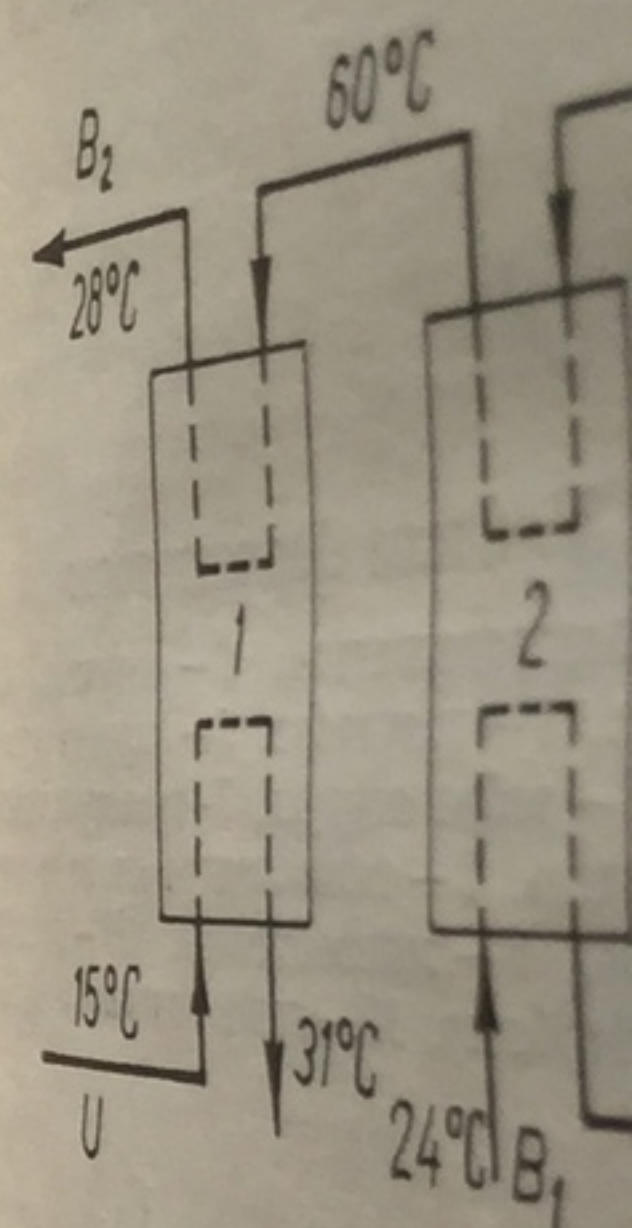


Рис. 31. Обработка среды повторным  
У — вода, Т — пар, В<sub>1</sub> — нестерильная среда,  
Теплообменника, 4 — выдерживатель трубка

Процесс стерилизации типа питательных сред можно легко проводить в ферментаторах. Самый легкий способ — ферментация проходит этот процесс, — ферментация биологическим оборудованием изводства. Они обычно представляют собой емкости (рис. 32) с мешалкой и охлаждающей рубашкой.

Они обычно представляют собой ферментаторы емкостью, объемом всего их изготовлено (рис. 32, 33). Высота ферментатора типа В (рис. 34). Диаметр аппарата. В производстве мешалками ферментаторы в аппарате имейте или радиальный ферментатор температуры в аппарате имейте типа змеевика. Ферментаторы типа для подачи питательных веществ.



могут применяться как для нагрева, так и для охлаждения питательных сред. Они легко разбираются и очищаются. Это дает возможность провести комплексную обработку растворов, регенерируя тепло по схеме, приведенной на рис. 31. В одной секции теплообменника с горячей питательной средой, подаваемой из выдерживателя трубчатого типа, стерилизуемую среду нагревают, в следующей секции среду при помощи пара нагревают до температуры выдерживания; в другой — охлаждают среду холодной водой.

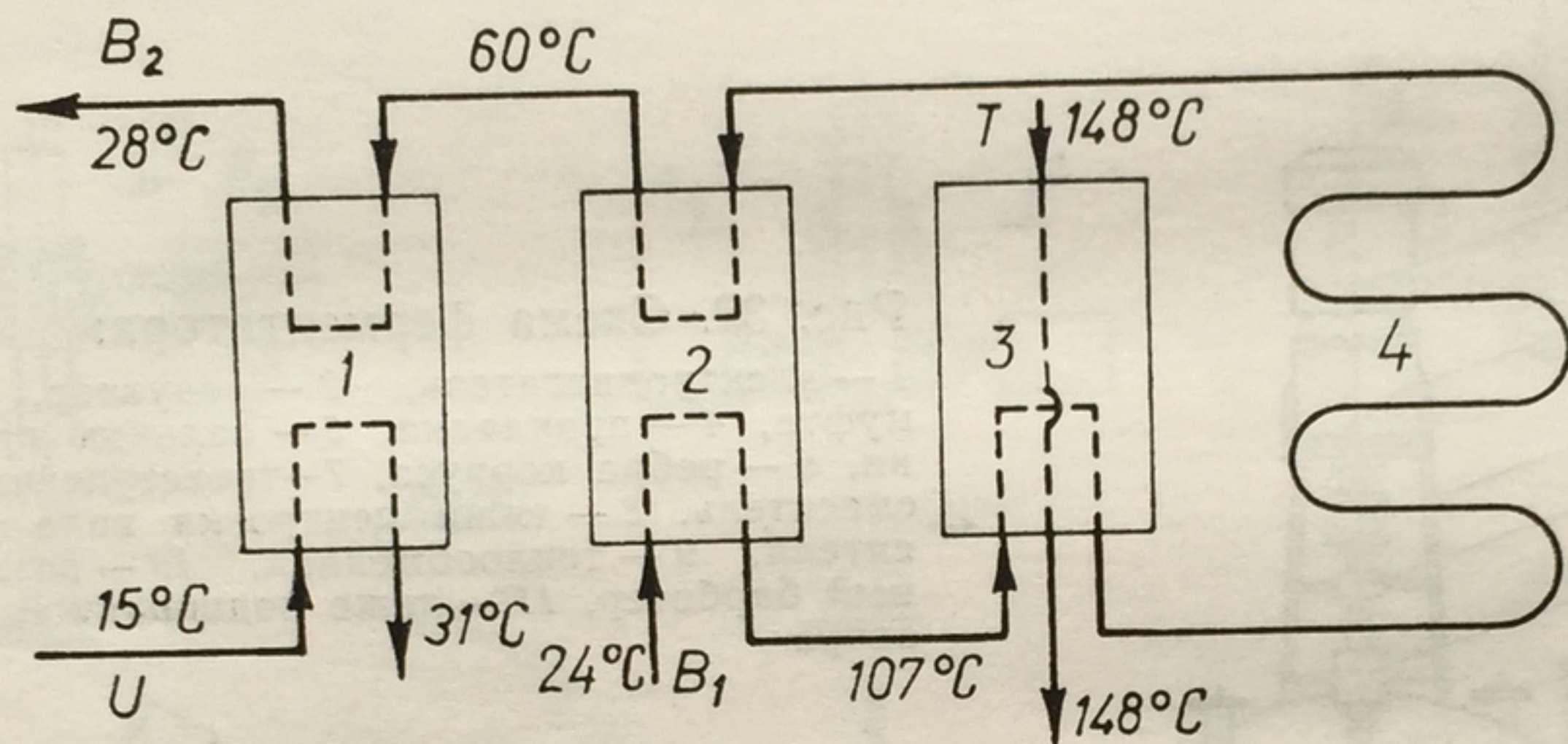


Рис. 31. Обработка среды повторным обогревом в пластинчатых теплообменниках:

$U$  — вода,  $T$  — пар,  $B_1$  — нестерильная среда,  $B_2$  — стерильная среда; 1, 2, 3 — секции теплообменника, 4 — выдерживатель трубчатого типа

Процесс стерилизации питательной среды в теплообменниках пластинчатого типа можно легко автоматизировать.

**Ферментаторы.** Самый ответственный процесс в микробиологическом синтезе — ферментация. Поэтому аппараты, в которых проходит этот процесс, — ферментаторы, являются главным технологическим оборудованием любого микробиологического производства.

Они обычно представляют собой герметические цилиндрические емкости, объем которых колеблется от 50 л до 200 м<sup>3</sup> (рис. 32, 33). Высота ферментеров в 2—2,5 раза превышает диаметр. Чаще всего их изготовляют из нержавеющей стали. В ферментаторах установлены мешалки турбинного, пропеллерного или другого типа (рис. 34). Диаметр турбины составляет  $\frac{1}{3}$  диаметра аппарата. В производстве антибиотиков широко распространены ферментаторы с мешалками, под которыми находится кольцевидный или радиальный воздушный барботер. Для поддержания температуры в аппарате имеется двойной кожух или теплообменник типа змеевика. Ферментатор оборудован арматурой и трубопроводами для подачи питательной среды, воды, пара, раствора,



регулирующего pH, пеногасителей, воздуха и других материалов.

Современные ферментаторы укомплектованы измерительными приборами и регулирующими устройствами. Ферментаторы оборудованы устройствами для пеногашения и смотровыми люками.

Главное требование к аппаратам — это сохранение стерильности, поэтому они должны быть герметичными, все линии трубопроводов должны быть доступны для обработки горячим паром. Очень тщательно и плотно нужно установить сальник оси мешалки (рис. 35).

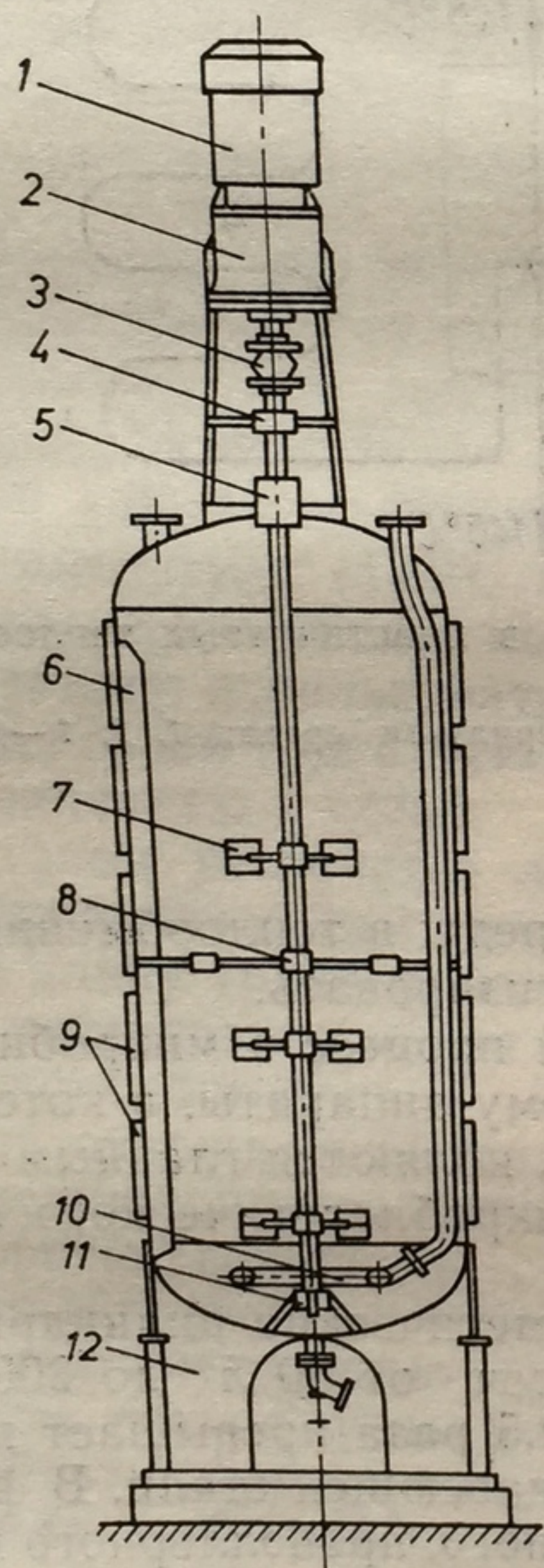


Рис. 32. Схема ферментатора:

1 — электродвигатель, 2 — редуктор, 3 — муфта, 4 — прокладка, 5 — сальник крышки, 6 — ребра корпуса, 7 — трехступенчатый смеситель, 8 — тяжи центровки вала смесителя, 9 — теплообменник, 10 — воздушный барботер, 11 — ложе подшипника, 12 — опора

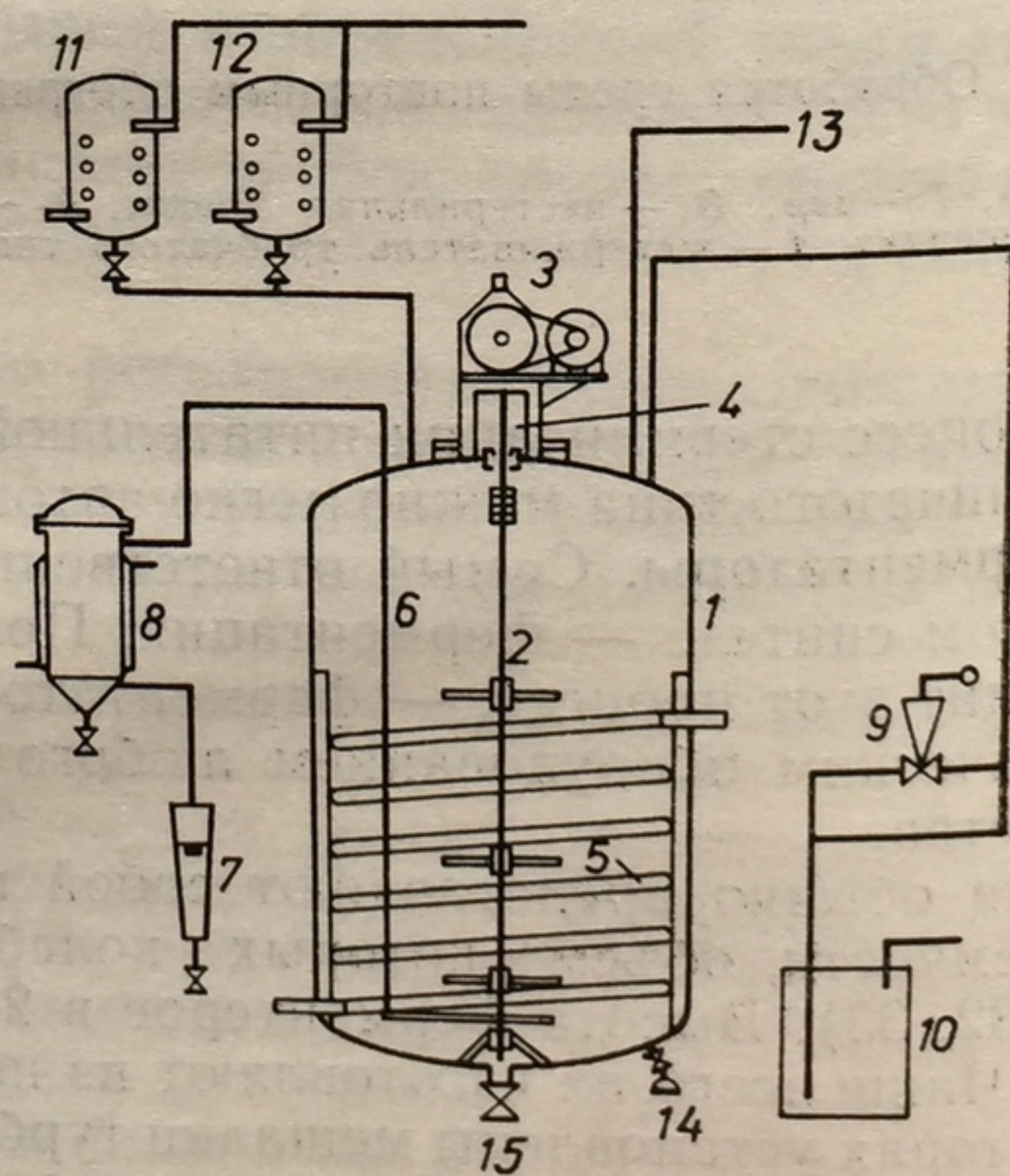


Рис. 33. Схема ферментатора с вспомогательными устройствами:

1 — корпус ферментатора, 2 — вал смесителя с турбинами, 3 — электродвигатель с коробчатой передачей, 4 — сальник вала смесителя, 5 — спираль теплообменника, 6 — перфорированный барботер, 7 — устройство для определения расхода воздуха, 8 — фильтр для стерилизации воздуха, 9 — воздушный клапан с регулировочным вентилем, 10 — уловитель, наполненный фенолом, 11 и 12 — резервуары для стерилизации пеногасителя и дополнительной подачи питательной среды во время ферментации, 13 — трубопровод для питательной среды, 14 — выводной вентиль, 15 — вентиль для отбора проб

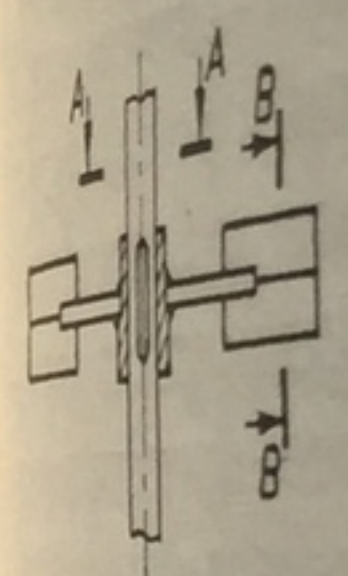


Рис. 34. Мешалки:

1 — турбинные, 2 — лопастные (для аппаратов с интенсивной аэрацией)

Конструкции ферментаторов обычно не превышают 10 м в высоту, где накапливается пена, при условии использования пеногасителей. В институте микробиологии СССР создан ферментатор с циркуляцией жидкости над поверхностью ра...



В связи с интенсивной аэрацией и перемешиванием во время ферментации питательная среда образует пену. Это может нарушить стерильность процесса и вызвать потери культуральной жидкости. Для ограничения пенообразования используют как химические средства (масло, олеиновая кислота, силиконы и др.), так и механические (вращающиеся лопасти в верхней части аппарата, циклоны, струи жидкости и др.). Существуют методы и специальные устройства химико-механического пеногашения.

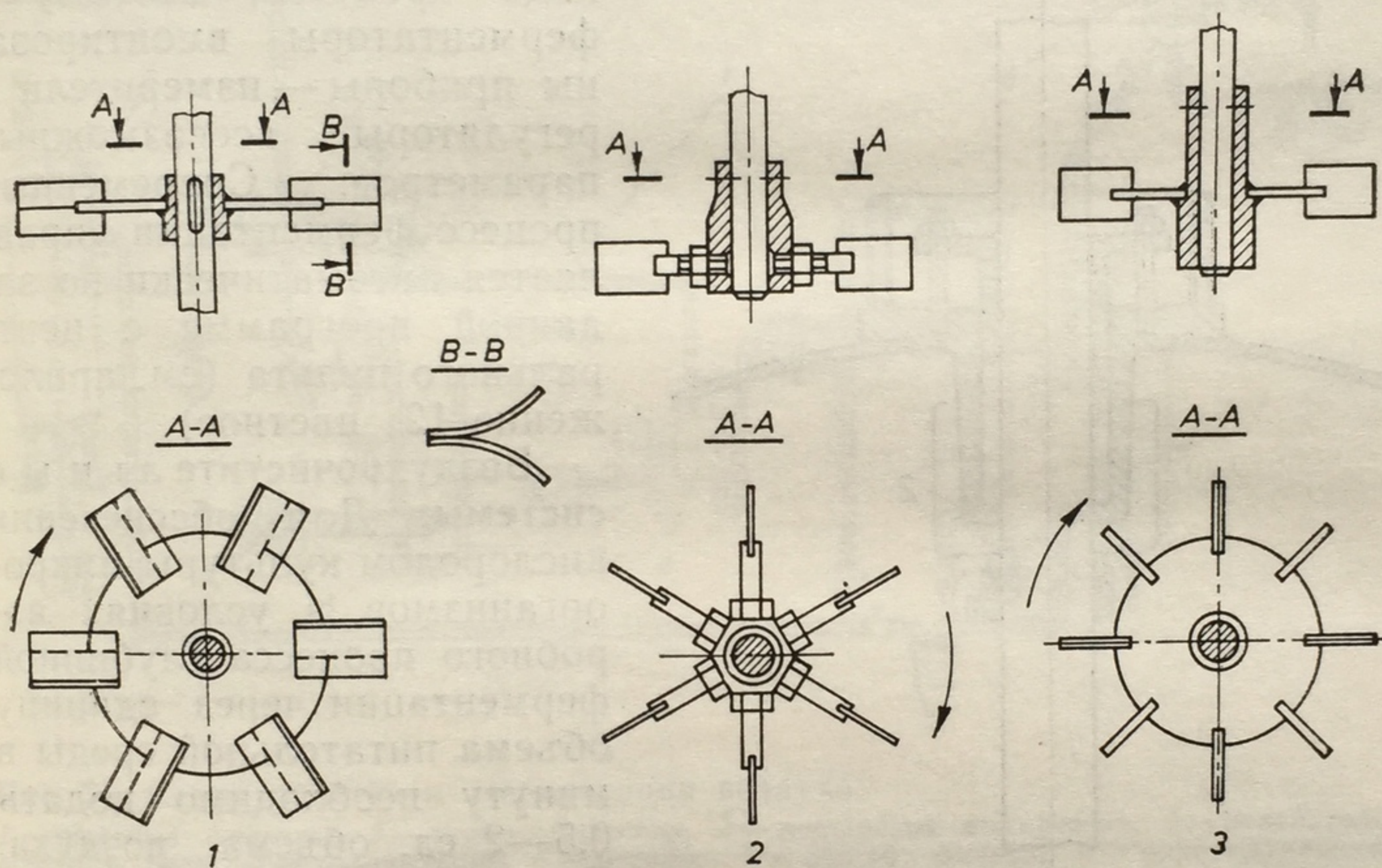


Рис. 34. Мешалки:

1 — турбинные, 2 — лопастные (для аппаратов небольшого объема), 3 — лопастно-дисковые

Конструкции ферментаторов различны. Рабочий объем ферментатора обычно не превышает  $7/10$  общего объема. Свободное пространство над поверхностью раствора используется как буферное, где накапливается пена и таким образом предотвращается потеря культуральной жидкости. Исследования показали, что в пенящейся жидкости условия аэрации лучше, чем в плотных растворах, при условии непрерывного перемешивания и циркуляции слоя пены, т. е. при исключении длительного нахождения микроорганизмов вне культуральной жидкости.

В Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН Латв. ССР создан ферментатор колонного типа с циклонным пеногасителем. В этом аппарате образуется интенсивная система циркуляции — жидкость пенится, пена заполняет пространство над поверхностью раствора, попадает в циклон, где снова пре-



вращается в жидкость и возвращается в ферментатор. В этих условиях рационально используется весь объем ферментатора, обеспечивается хорошая аэрация и значительно уменьшается необходимость в использовании химических пеногасителей, снижаются энергозатраты.

К ферментаторам как главным аппаратам микробиологического синтеза предъявляются самые высокие требования. Важно

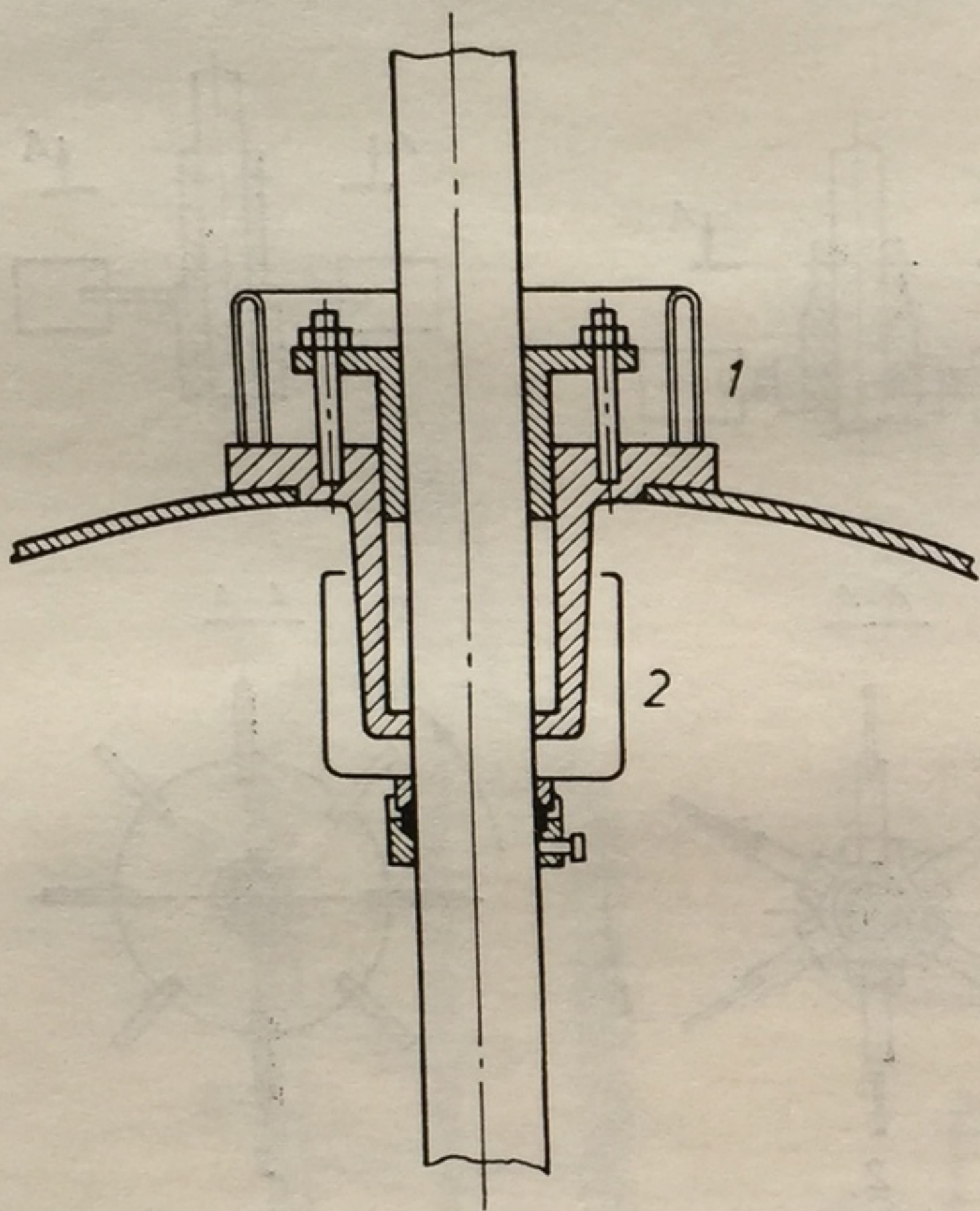


Рис. 35. Сальник смесителя:  
1 — обогревательная камера, 2 — цилиндрический сосуд со стерильным маслом

иметь полную информацию о ходе процесса, поэтому в ферментаторы вмонтированы приборы — измерители и регуляторы всевозможных параметров. Современный процесс ферментации управляется автоматически по заданной программе с центрального пульта (см. приложение 12 цветное).

**Воздухоочистительные системы.** Для обеспечения кислородом культуры микроорганизмов в условиях аэробного процесса глубинной ферментации через единицу объема питательной среды в минуту необходимо подать 0,5—2 ед. объема воздуха. Его надо очистить от механических частиц, микроорганизмов и химических веществ перед введением в ферментатор. Для очистки воздуха в микробиологической промышленности обычно используют фильтрацию (рис. 36). Воздух подают обычно под давлением 0,2 МПа (2 кгс/см<sup>2</sup>). Для сжатия воздуха чаще всего используют турбокомпрессоры или поршневые компрессоры. Перед подачей в компрессор воздух очищается от грубых частиц на масляных фильтрах. В ферментатор он проходит сначала через общий, затем через индивидуальный фильтр. Эти фильтры выполняют функцию холодной стерилизации воздуха, отделяя клетки микроорганизмов. Схема фильтра приведена на рис. 37. Как общие, так и индивидуальные фильтры заполняют гранулированным зернистым и волокнистым фильтровальным материалом, используя гранулированный уголь (КАД по ТУМХП 3136—52) и стеклянную

Воздухоочистительные системы. Для обеспечения кислородом культуры микроорганизмов в условиях аэробного процесса глубинной ферментации через единицу объема питательной среды в минуту необходимо подать 0,5—2 ед. объема воздуха. Его надо очистить от механических частиц, микроорганизмов и химических веществ перед введением в ферментатор. Для очистки воздуха в микробиологической промышленности обычно используют фильтрацию (рис. 36). Воздух подают обычно под давлением 0,2 МПа (2 кгс/см<sup>2</sup>). Для сжатия воздуха чаще всего используют турбокомпрессоры или поршневые компрессоры. Перед подачей в компрессор воздух очищается от грубых частиц на масляных фильтрах. В ферментатор он проходит сначала через общий, затем через индивидуальный фильтр. Эти фильтры выполняют функцию холодной стерилизации воздуха, отделяя клетки микроорганизмов. Схема фильтра приведена на рис. 37. Как общие, так и индивидуальные фильтры заполняют гранулированным зернистым и волокнистым фильтровальным материалом, используя гранулированный уголь (КАД по ТУМХП 3136—52) и стеклянную

Длительность стерилизации воздуха в течение 2—3 ч. Фильтр очищает материал в 1—2 мес, а в общем аппарате для обработки микроорганизмов отделяет массу дрожжей. Клеточности можно переработать в роторе дрожжевой жидкости

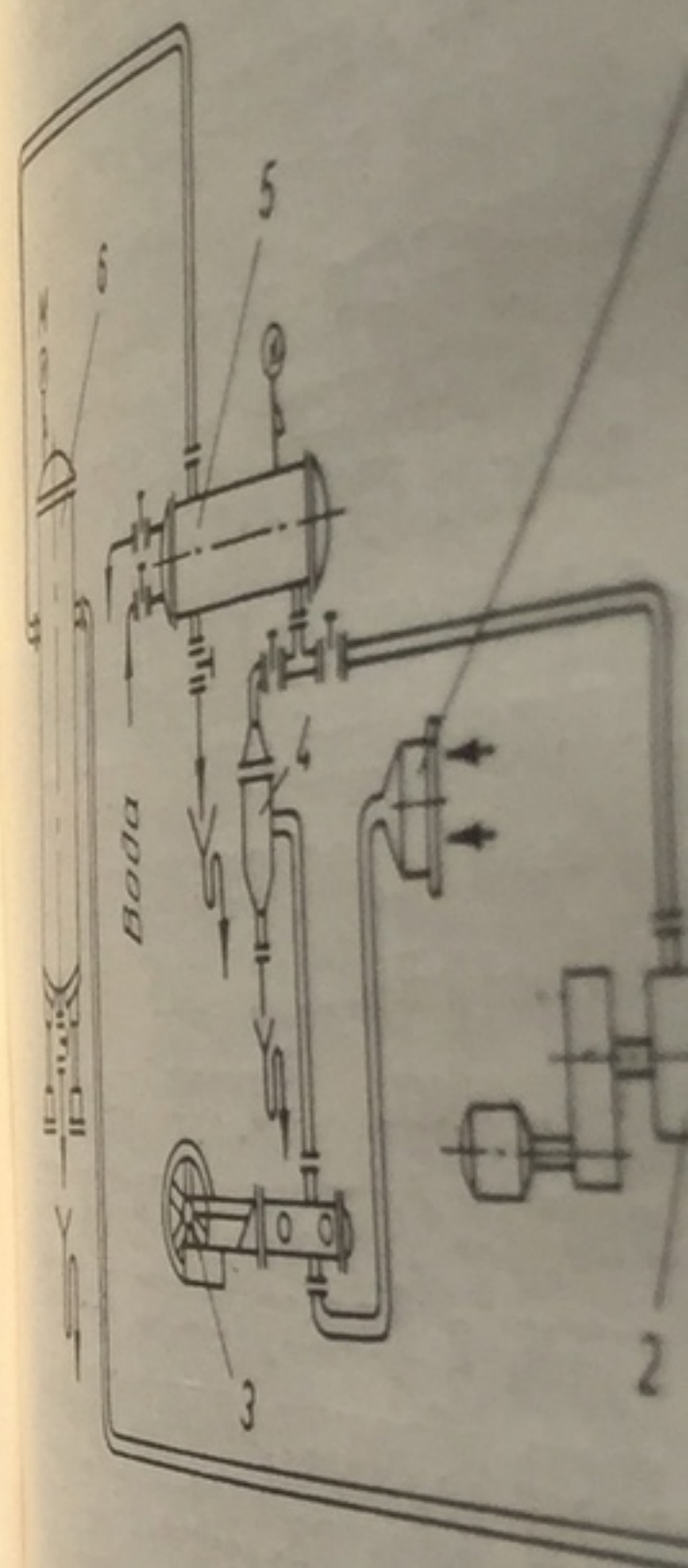


Рис. 36. Схема очистки и стерилизации воздуха:  
1 — пылевой фильтр, 2 — турбокомпрессор, 3 — ловушка для воды, 4 — фильтр, 5 — холодильник, 6 — ресивер, 9 — манометр

Длительность стерилизации воздуха в течение 2—3 ч. Фильтр очищает материал в 1—2 мес, а в общем аппарате для обработки микроорганизмов отделяет массу дрожжей. Клеточности можно переработать в роторе дрожжевой жидкости



вату, диаметр которой равен 18 мкм (ГОСТ 5174—49). В последнее время начали использовать специальные бактерицидные волокна. Толщина фильтрующего слоя обычно 0,4—0,75 м. Индивидуальные фильтры часто заполняют стеклянной, хлопчатобумажной ватой или активным углем.

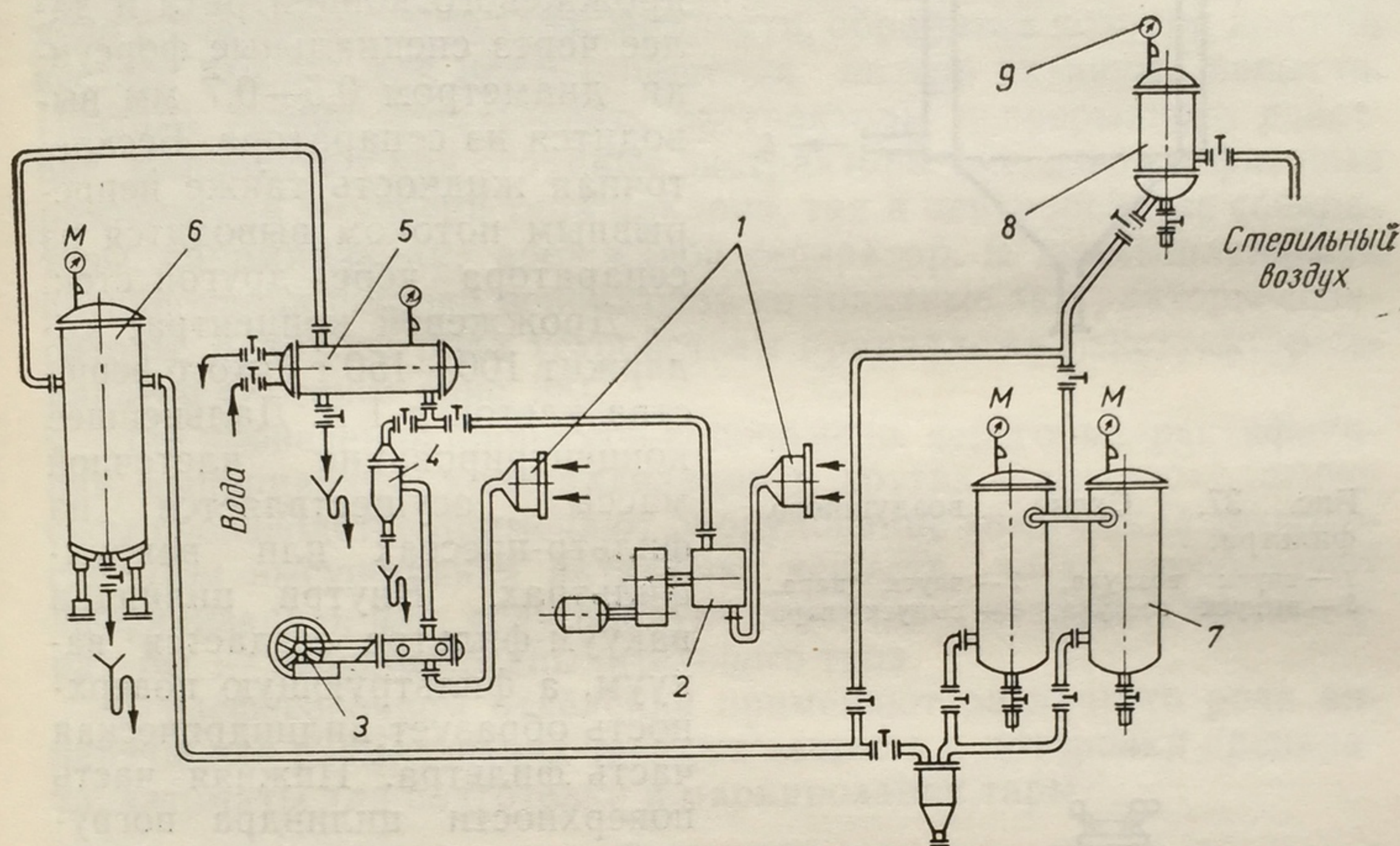


Рис. 36. Схема очистки и стерилизации воздуха:

1 — пылевые фильтры, 2 — турбокомпрессор, 3 — поршневой компрессор, 4 — отделитель масла и воды, 5 — холодильник, 6 — ресивер, 7 — общий фильтр, 8 — индивидуальный фильтр, 9 — манометр

Длительность стерилизации фильтров 1—1,5 ч при температуре 120—126°C. После стерилизации их сушат в потоке сухого воздуха в течение 2—3 ч. Фильтры необходимо стерилизовать не реже одного раза в месяц, а также после попадания инфекции.

Фильтрующий материал в индивидуальных фильтрах меняют один раз в 1—2 мес, а в общих фильтрах — через 6—8 мес.

**Аппаратура для обработки продуктов ферментации.** Биомассу микроорганизмов отделяют от культуральной жидкости центрифугированием, фильтрацией или коагуляцией.

Клеточную массу дрожжей отделяют в сепараторах с частотой вращения ротора до 4800 об/мин. В сепараторах большой мощности можно переработать до 80 м<sup>3</sup> дрожжевой суспензии в час. В роторе дрожжевого сепаратора имеется система тарелок, разделяющая жидкость на слои толщиной 1 мм. Под влиянием



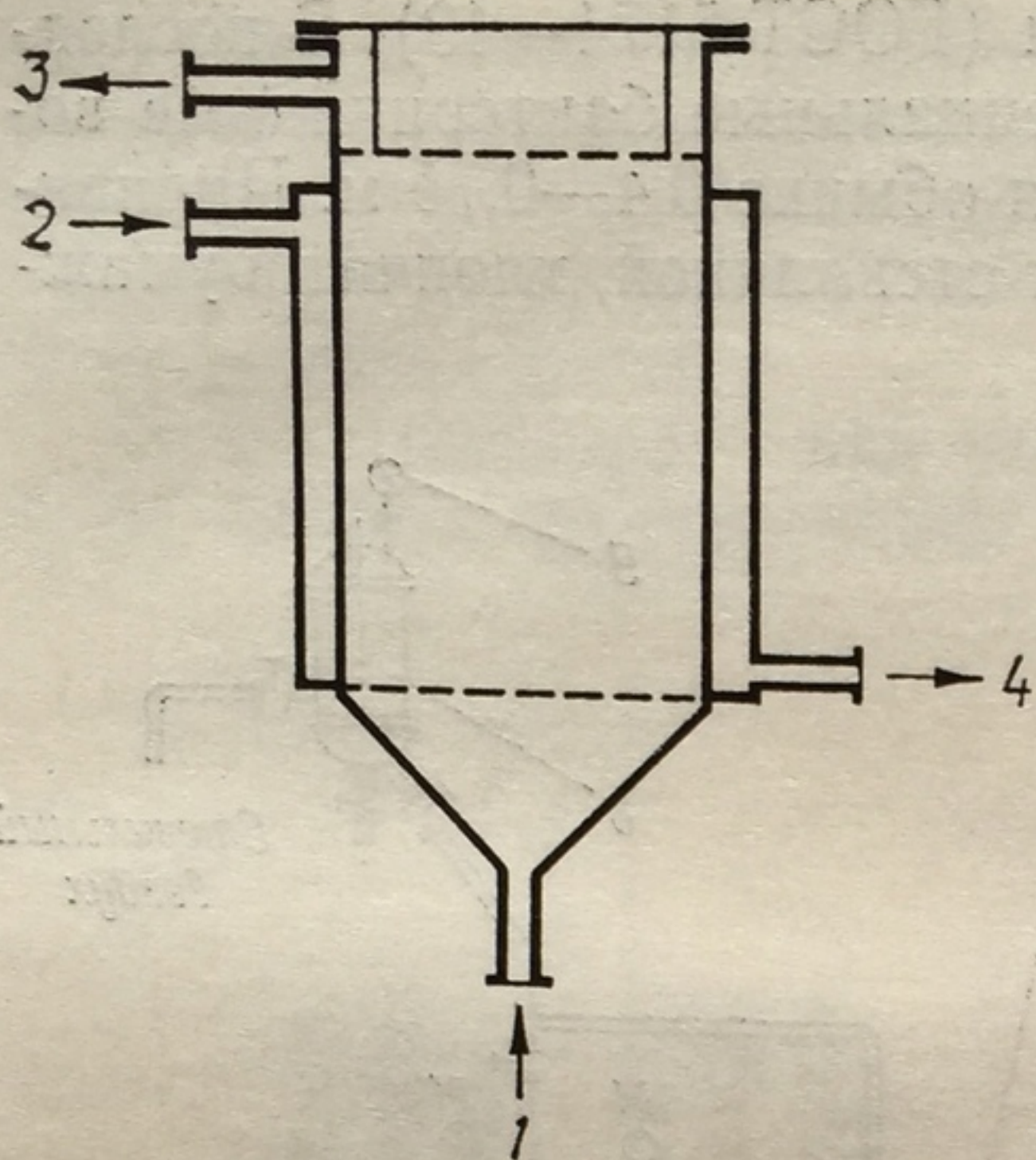


Рис. 37. Схема воздушного фильтра:  
1 — впуск воздуха, 2 — впуск пара,  
3 — выпуск воздуха, 4 — выпуск пара

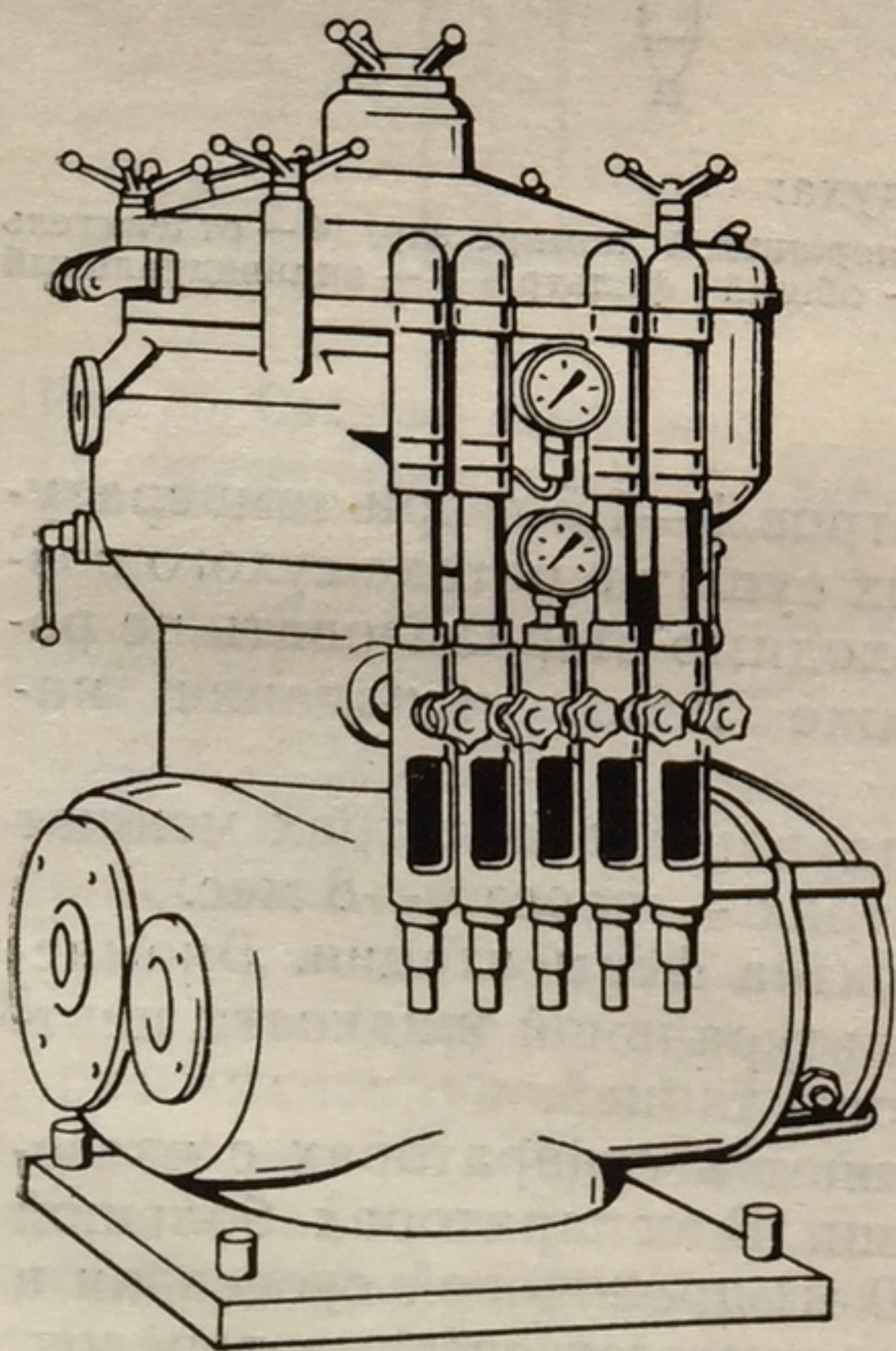


Рис. 38. Экстрактор-сепаратор

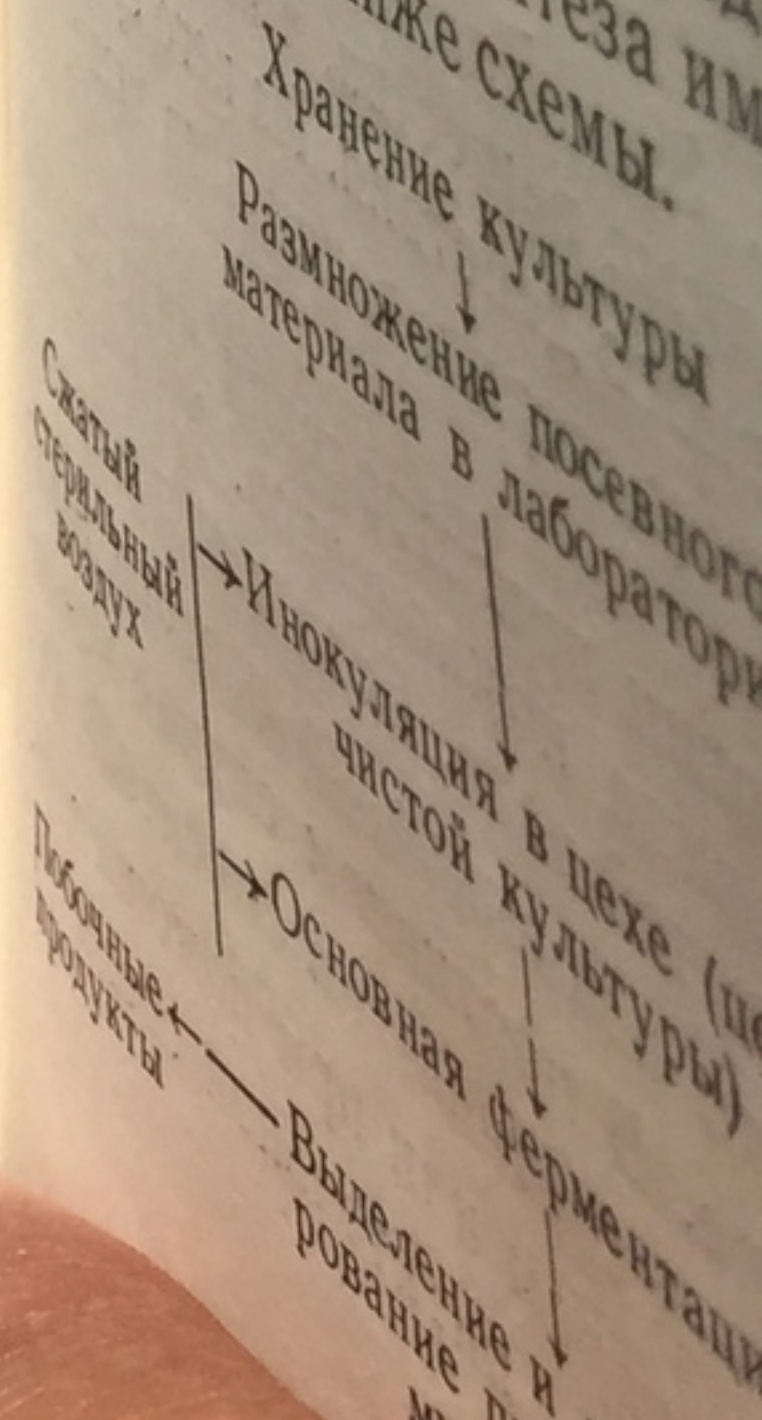
центробежных сил более плотная клеточная фракция оседает на нижней поверхности тарелок, откуда затем непрерывным потоком движется к сборникам дрожжевого концентрата и далее через специальные форсунки диаметром 0,5—0,7 мм выводится из сепаратора. Бесклеточная жидкость также непрерывным потоком выводится из сепаратора через другой сток.

Дрожжевой концентрат содержит 100—150 г сухого вещества клеток в 1 л. Дальнейшее концентрирование клеточной массы осуществляется на фильтр-прессах или вакуум-фильтрах. Внутри цилиндра вакуум-фильтра создается вакуум, а фильтрующую поверхность образует цилиндрическая часть фильтра. Нижняя часть поверхности цилиндра погружена в клеточную суспензию. При вращении цилиндра биомасса оседает на поверхности фильтра и после подсушивания отделяется ножами, проволокой или другим способом. Вакуум-фильтры используют для отделения от культуральной жидкости мицелия плесневых грибов и актиномицетов.

В производстве антибиотиков используют вакуум-фильтры непрерывного действия с автоматической сменой операций фильтрации, мойки, сушки и снятия отфильтрованного слоя. Для улучшения хода фильтрации суспензию клеток обрабатывают кислотой, электролитами или термически, вызывая таким образом коагу-

...клеток. Иногда к суспензии добавляют...  
...для отделения биомассы...  
...центрифуги.  
...жидкости невелик, и...  
...жидкости...  
...предотвращения...  
...использовать экстра...  
...как струйные экстра...  
...циклона,  
...дрожжевой се...  
...используют ко...  
...устройств...  
...«Россия» (рис. 38).

ЭТАПЫ ТЕХНО...  
Хотя для получения продуктов...  
...различные культур...  
...питательные сред...  
...синтеза им...  
...ниже схемы.





ляцию клеток. Иногда к суспензии добавляют фильтрующие наполнители. Для отделения биомассы бактерий можно использовать осадительные центрифуги.

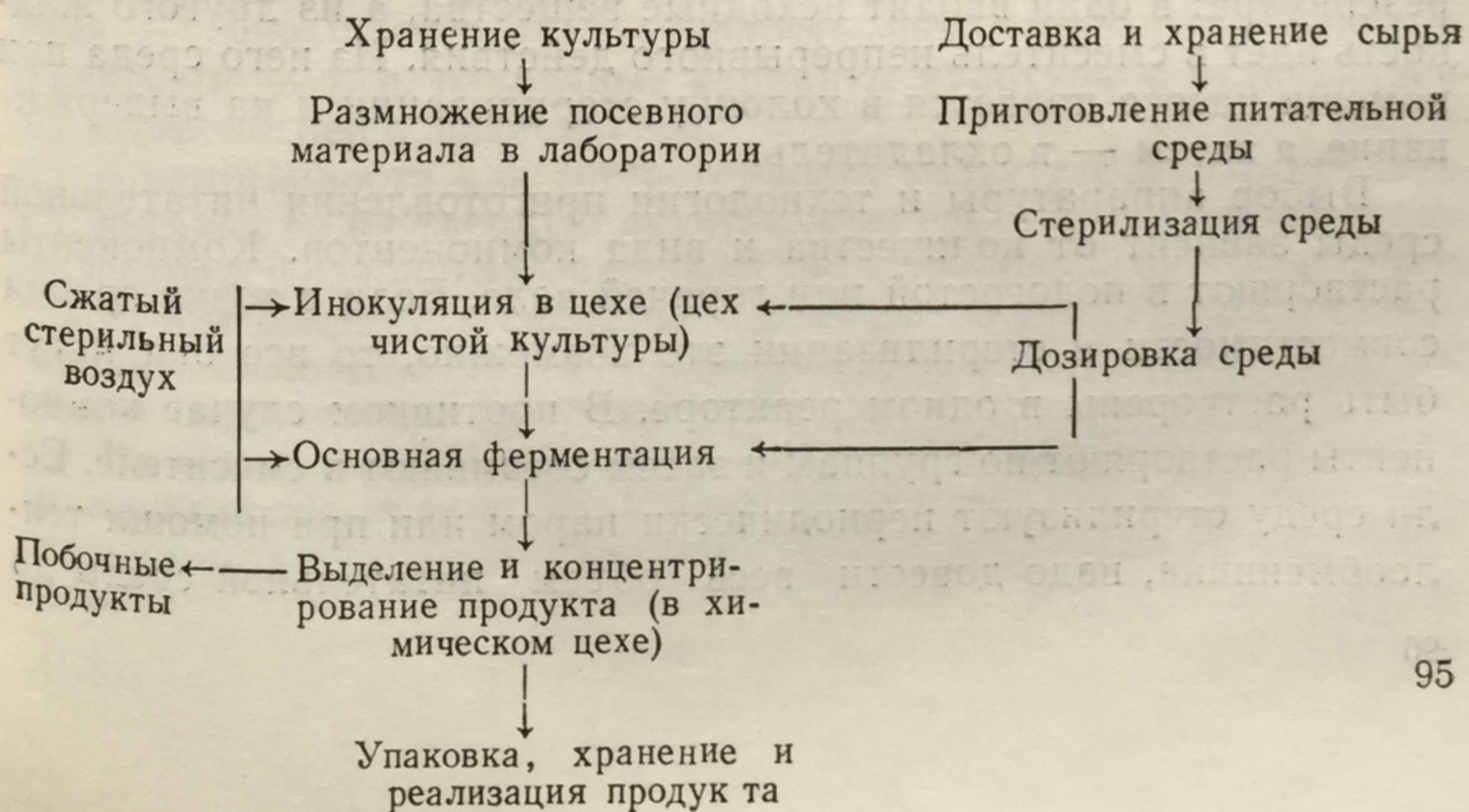
Если объем жидкости невелик, для экстрагирования активных веществ из культуральной жидкости используют экстракторы периодического действия. Однако в промышленности обычно имеют дело с большими объемами жидкости, обработка которой должна вестись быстро для предотвращения потерь активных веществ. Поэтому лучше использовать экстракторы непрерывного действия. Используют как струйные экстракторы-смесители и фазовые разделители эмульсии типа циклона, так и центробежные сепараторы, напоминающие дрожжевой сепаратор. В промышленности антибиотиков широко используют компактные экстракторы-сепараторы. К такого рода устройствам принадлежит экстрактор-сепаратор «Россия» (рис. 38).

Для проведения процессов ионообмена, перегонки, ректификации, выпаривания, кристаллизации и других в микробиологическом производстве применяют оборудование химической технологии. Для высушивания активных веществ часто используют лиофилизацию, или, если продукт устойчив к воздействию температуры, — сушилки распылительного типа.

В расфасовочном отделении применяют различного рода аппараты для размельчения твердых веществ и дозировки препарата, автоматы для подготовки и маркирования тары.

### ЭТАПЫ ТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПРОЦЕССА

Хотя для получения продуктов микробиологического синтеза применяются различные культуры микроорганизмов и используются разные питательные среды и режимы культивирования, тем не менее процессы синтеза имеют общую структуру. Это видно из приведенной ниже схемы.





Для всего процесса производства составляют технологический регламент, включающий описание культуры и подробное описание технологического процесса. Готовая продукция должна соответствовать техническим условиям (ТУ), временным техническим условиям (ВТУ) или государственному стандарту (ГОСТ). Они

определяют качество препарата, методы его проверки и основные показатели.

**Приготовление и стерилизация питательной среды.** Для выращивания микроорганизмов в цехе чистой культуры и в цехе основной ферментации необходима стерильная питательная среда. Это делают в сырьевом или рецептурном цехе. Среду готовят по периодическому или непрерывному методу. В отдельных случаях приготовление и стерилизация среды осуществляются прямо в ферментаторе. На современных микробиологических предприятиях все чаще используют непрерывный ме-

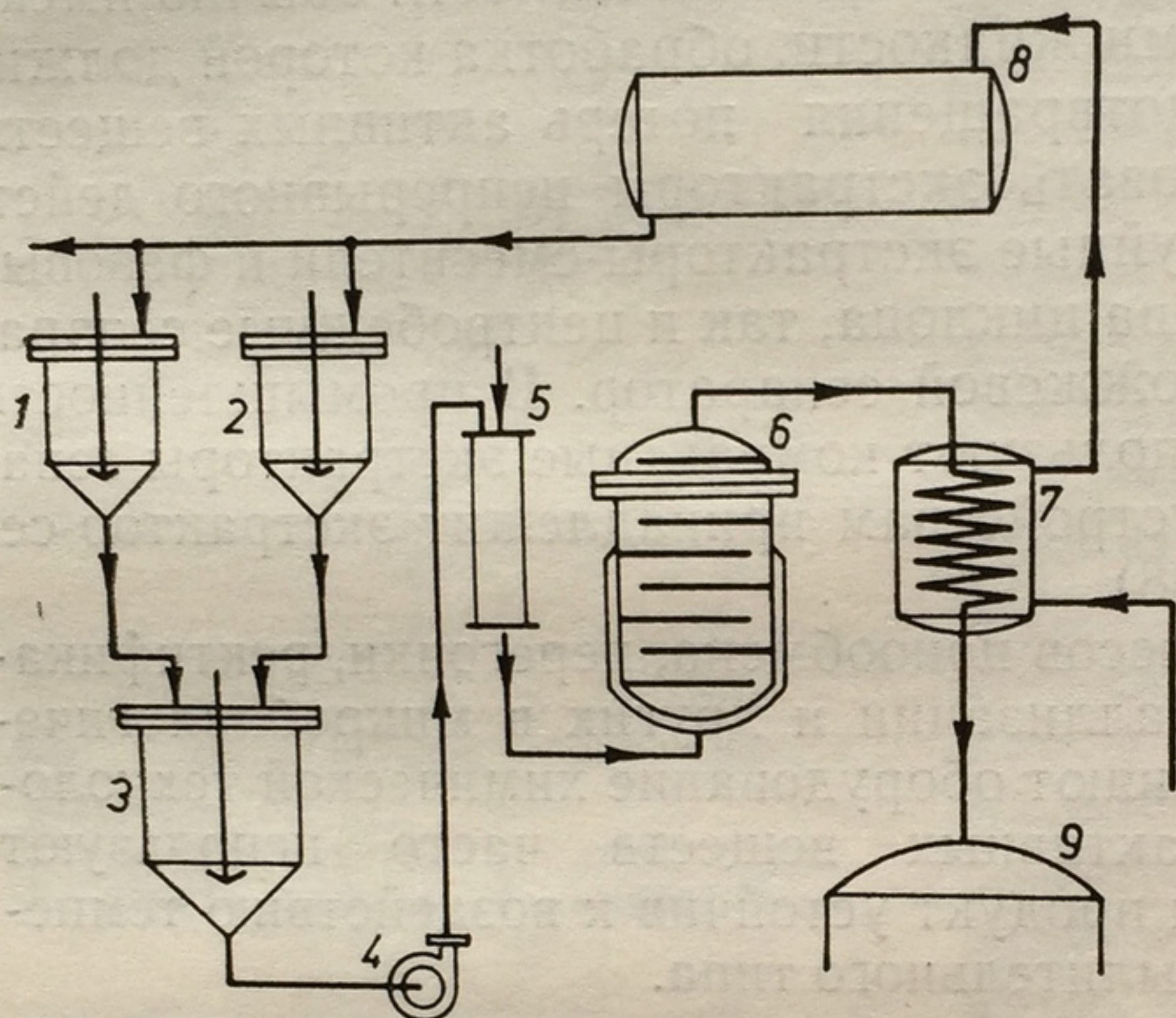


Рис. 39. Схема непрерывного приготовления питательной среды:

1 и 2 — резервуары для растворения исходных веществ, 3 — резервуар для смешивания растворов, 4 — насос для передачи среды, 5 — колонна или инжектор для нагрева среды паром, 6 — закрытый сосуд для стерилизации, 7 — охладитель, 8 — резервуар для спуска нагретой воды, 9 — ферментатор

тод приготовления среды (рис. 39). Для этого используют два резервуара: в один вводят исходные вещества, а из другого жидкость идет в смеситель непрерывного действия. Из него среда при помощи насоса подается в колонну стерилизации и на выдерживание, а затем — в охладитель.

Выбор аппаратуры и технологии приготовления питательной среды зависит от количества и вида компонентов. Компоненты растворяют в подогретой или горячей воде. Если с точки зрения совместимости и стерилизации это возможно, то все они могут быть растворены в одном реакторе. В противном случае компоненты растворяют по группам и затем соединяют в смесителе. Если среду стерилизуют периодически паром или при помощи теплообменника, надо довести весь объем питательной среды до



120°C и после этого по меньшей мере час выдержать при 120—124°C. Затем среду охлаждают до 29—30°C.

При непрерывной стерилизации нагревание среды до температуры стерилизации, выдерживание при этой температуре и охлаждение происходят в потоке. Прямая подача пара в среду разбавляет ее на 10—20%, это надо учитывать при приготовлении среды. При работе с колонками используют пар давлением 0,5 МПа (5 кгс/см<sup>2</sup>). Скорость потока среды в колонке зависит от состава и температуры.

В кожух выдерживателя вводят пар давлением 0,25 МПа (2,5 кгс/см<sup>2</sup>). Длительность выдерживания (5—7 мин) зависит от состава и свойств питательной среды. Температура среды, вытекающей из выдерживателя, 124—130°C.

Приготавливая среду, надо следить, чтобы в процессе стерилизации не происходили нежелательные реакции (карамелизация, образование меланоидинов). Если в цехах чистой культуры и основной ферментации работают с разными средами, то необходимо иметь две и более линий для приготовления питательных сред. В цехе приготовления среды необходимо иметь различную измерительную аппаратуру (весы, мерную посуду, дозаторы), аппаратуру для растворения вязких и твердых веществ, снабженную мешалками (обычные реакторы), центрифуги для осветления растворов (кларификаторы), устройства для декантации и др.

**Хранение культуры и размножение посевного материала в лаборатории.** Культуры микроорганизмов — продуцентов веществ — заводы получают из институтов (коллекции культур) в пробирках на косом агаре или в ампулах, законсервированными в виде чистых культур. Каждая культура имеет паспорт с подробным описанием морфологии, физиологии, характеристики среды для культивирования и хранения культуры.

При длительном хранении культуры важно сохранить ее свойства. При частом пересеве она со временем может изменять свойства — уменьшается продуктивность, появляется гетерогенность культуры, — т. е. различные варианты культуры с отличающейся морфологией и физиологией.

В гомогенности или гетерогенности культуры можно убедиться, высевая ее на твердую питательную среду и изучая морфологические и физиологические свойства колоний.

Чтобы сохранить свойства культуры без изменений, ее надо хранить в соответствующих условиях. В основе хранения культур лежит охлаждение, замораживание или обезвоживание.

Во всех этих случаях ограничивается или даже прекращается клеточный обмен веществ. Иногда (при замораживании и обезвоживании) клетки приводят в состояние анабиоза или преданабиоза.



На практике культуры хранят различными способами:

1) на косом агаре при низкой температуре ( $1 \div -5^{\circ}\text{C}$ ) можно хранить культуру 1—2 мес., а иногда и дольше;

2) замораживание и хранение при температуре ниже  $-20^{\circ}\text{C}$  позволяет сохранить культуру в течение нескольких месяцев. Нежелательно многократное оттаивание и замораживание;

3) на твердых средах под слоем стерильного парафина или минерального масла можно хранить дрожжи, плесневые грибы. Менее пригоден этот способ для хранения актиномицетов. Слой масла над поверхностью косого агара должен быть не менее 1 см. Масло предохраняет культуру от высыхания и доступа кислорода;

4) на агаре без добавления питательных веществ (допускаются очень незначительные добавки питательных веществ) хранят актиномицеты;

5) при лиофилизации культуру замораживают при температуре до  $-80^{\circ}\text{C}$  (обычно при  $-30^{\circ}\text{C}$ ) и подвергают сублимации в вакууме (остаточное давление 6—130 кПа). Для предохранения клеток от инактивации используют защитные среды (сыворотка крови, бульон, сахароза, смесь песка и глины и др.). Лيوфилизированную чистую культуру в ампулах хранят в течение нескольких лет;

6) хранение в стерильной смеси песка и глины заключается в следующем. Нанесенные на эту смесь микроорганизмы или суспензию спор сушат при комнатной температуре и при такой же температуре хранят в посуде, закрытой ватной пробкой;

7) консервация спор (актиномицеты) в песке. Около 1,0 г стерильного песка насыпают в пробирку, высевают туда же споры и сушат их в эксикаторе над силикагелем или хлористым кальцием. После сушки пробирки герметично закрывают пробками и заливают парафином.

Через определенное время, специфичное для каждого вида хранения, культуру пересевают.

Перед началом технологического процесса культуру размножают в лаборатории в стерильных условиях при оптимальном составе среды и режиме выращивания (рН, температура, длительность). С поверхности косого агара культуру стерильно переносят в колбы объемом 100—200 мл и инкубируют в термостате или на качалке в зависимости от потребности культуры в кислороде. В производстве дрожжей для этого используют, например, колбы Пастера (0,45 л), затем колбы Карлсберга (4,5 л). Длительность каждой стадии выращивания 24 ч. На этом этапе дрожжи растут на полноценной среде — 10%-ном солодовом сусле. Содержимое колб Карлсберга используют в качестве посевного материала для первого инокулятора цеха чистой культуры. Одна-



ко последовательность стадий не всегда одинакова. В производстве аминокислот, например лизина, в цех чистой культуры поступает посевной материал, полученный из колб на качалке.

Иногда для уменьшения опасности заражения инфекцией в инокулятор культуру вносят прямо из пробирок. При этом длительность инокуляции увеличивается.

В производстве антибиотиков часто используют спорный материал. При этом в лабораторных условиях культуру размножают двумя способами:

1) культуру продуцента высевают на косой агар, инкубируют до образования спор и смывают их стерильной водой. Суспензию спор снова переносят в свежую агаризованную среду для получения спорового материала второго поколения. Выросшие споры еще раз смывают стерильной водой и суспензию используют для получения первого вегетативного поколения продуцента на жидкой среде;

2) как и в первом случае, культуру продуцента высевают на агаризованную среду для получения спор. Полученную суспензию спор сразу же вносят в колбы с жидкой средой и выращивают их на качалке. Полученный таким образом вегетативный материал продуцента первого поколения используют в качестве посевного материала для второго поколения продуцента в колбах с жидкой средой. Вегетативный материал второго поколения используют для внесения в инокулятор. Для размножения спорового материала широко используют среды на сыпучем материале — зерне, крупе, лузге и др.

Для получения спор многих продуцентов антибиотиков часто используют среду из зерен проса. Спорный материал с таких сред можно засеивать прямо в инокулятор, минуя размножение на жидкой среде в колбах. Иногда в лабораторной практике культуру продуцента начинают размножать сразу на жидкой среде в колбах, исключая предварительное получение спор.

Для обеспечения стабильного выхода активных веществ в производственных условиях надо создать достаточный запас культуры продуцента на длительный период времени (год и более), но нельзя часто менять технологию приготовления посевного материала.

**Получение посевного материала в цехе чистой культуры.** Дальнейшее размножение посевного материала обычно идет в две стадии: в цехе чистой культуры и в отделе инокуляции. Аппараты первой стадии часто называют инокуляторами, аппараты второй стадии — посевными ферментаторами.

Схема приготовления посевного материала из споровых культур на предприятиях по производству антибиотиков показана на рис. 40.



Для приготовления посевного материала используют полноценную среду, тщательно проверенную различными химическими и микробиологическими методами. Количество питательной среды в аппарате не должно превышать 60% общего объема. Если культуру в инокулятор вносят из колб, то количество посевного материала составляет примерно 0,1% объема среды. Такое небольшое количество посевного материала требует длительного периода инокуляции (2—4 сут). Для посевных ферментаторов используют 10—12% инокулята, поэтому продолжительность приготовления посевного материала на этой стадии уменьшается и

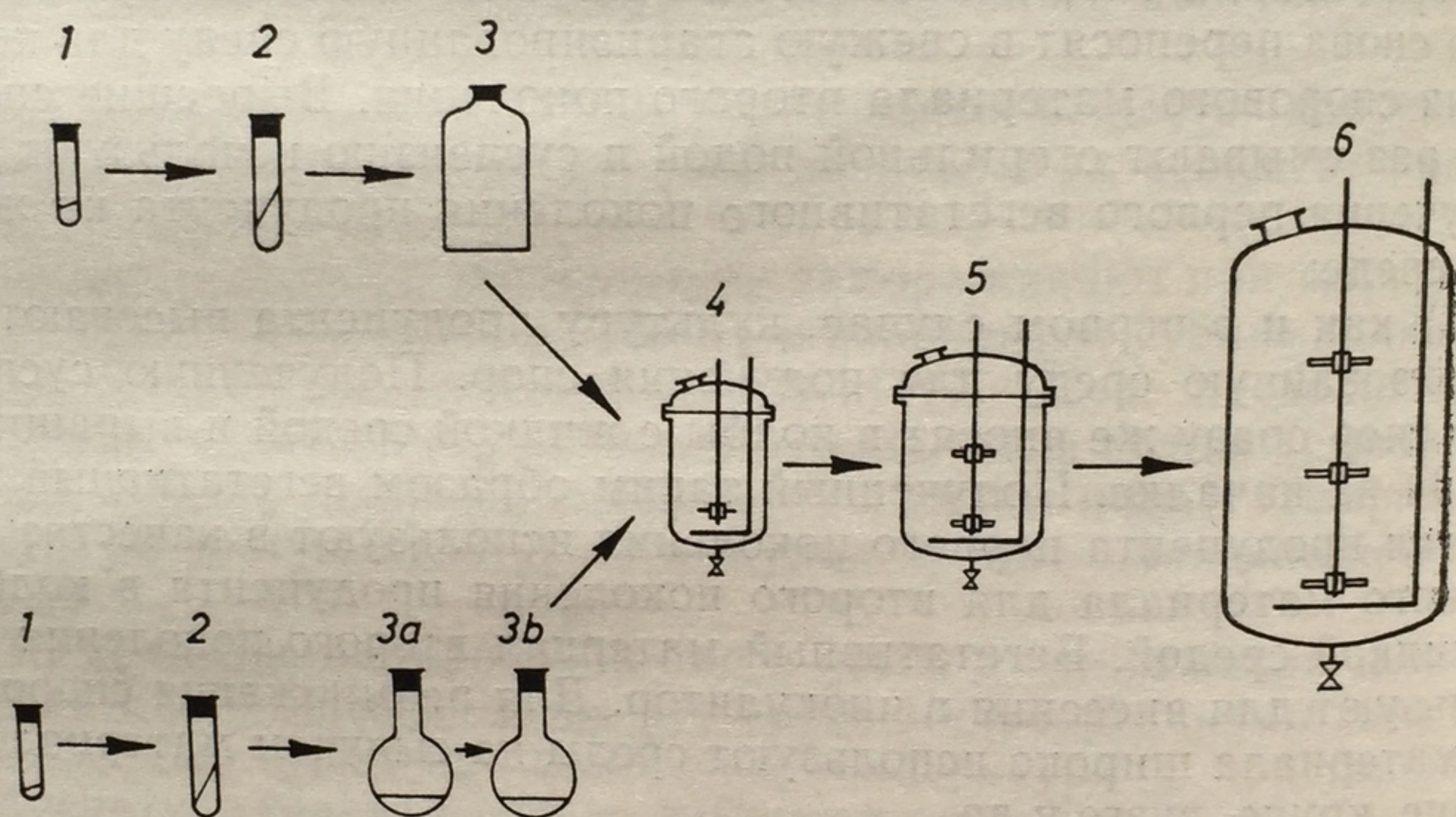


Рис. 40. Схема приготовления посевного материала:

1 — законсервированный штамм продуцента, 2 — первое поколение на косом агаре в пробирке с образованием спор, 3 — второе поколение на твердой среде в колбах с образованием спор, 3a и 3b — первое и второе поколения на жидкой среде в колбах, 4 — инокулятор, 5 — посевной ферментатор, 6 — ферментатор

обычно не превышает 1 сут. Во время приготовления посевного материала надо следить, чтобы в аппаратах был оптимальный режим культивирования. Три раза в сутки отбирают образцы для микробиологического и биохимического анализов. Посевной материал для главной ферментации готовят в количестве 5—20% объема используемой питательной среды.

**Главная ферментация.** Обычно она протекает в ферментаторах большого объема. В СССР для стерильной ферментации широко используют аппараты объемом 50 м<sup>3</sup> с механическими мешалками. Перед заполнением аппарата средой его моют, проверяют на герметичность, стерилизуют горячим паром как сам ферментатор, так и систему трубопроводов. Для обеспечения стерильности ферментатора часто применяют предварительную обработ-



ку его химическими дезинфицирующими веществами (этот процесс проводят непосредственно перед обработкой горячим паром). После этого его заполняют стерильной охлажденной питательной средой. Количество среды в ферментаторе не должно превышать 70% его общего объема. Затем по линии посевного материала с помощью стерильного воздуха в ферментатор вводят посевной материал. Уже перед его подачей температура и pH питательной среды должны быть доведены до оптимальных значений для данной культуры. Соответственно регулируют интенсивность аэрации и перемешивания среды. Для предотвращения попадания нестерильного атмосферного воздуха в аппарат давление воздуха над поверхностью жидкости повышают на 20—30 кПа (0,2—0,3 кгс/см<sup>2</sup>). В пространстве над жидкостью обычно скапливается пена. Если ее слой сильно увеличивается, то в аппарат вводятся химические пеногасители. Во время ферментации автоматически регулируется температура и pH среды, в случае необходимости добавляют растворы кислоты или щелочи. По специальному графику берут образцы жидкости из ферментатора для биохимического и микробиологического контроля. При получении активных веществ методом периодической ферментации различают два этапа.

На *первом этапе* идет интенсивное размножение культуры. Она проходит через все характерные фазы развития. На этом этапе компоненты питательной среды используются главным образом на получение энергии и конструктивный обмен веществ — происходит постепенная ассимиляция источников углерода и азотсодержащих веществ, в среде накапливаются продукты окисления углеводов, например кислоты.

На *втором этапе* происходит интенсивный синтез нужного метаболита (иногда он идет параллельно процессу роста культуры), наблюдается старение клеток и их автолиз.

Ферментацию прекращают, когда в среде накапливается максимальное количество полезного продукта. Конец ферментации можно определить и микробиологически по морфологическим изменениям клеток продуцента. Окончив ферментацию, культуральную жидкость охлаждают до 10—15°C и перекачивают в резервуары, из которых она постепенно подается на дальнейшую обработку.

**Выделение продукта из культуральной жидкости.** В состав культуральной жидкости входят остатки использованной питательной среды, синтезированные метаболиты и клеточная масса продуцента. В наиболее простом случае всю культуральную жидкость можно использовать как готовый продукт, например при получении бактериальных удобрений, если их применяют в жидком виде. В спиртовой промышленности амилолитические фер-



менты плесневых грибов иногда используют в жидком виде. При производстве витаминных и аминокислотных концентратов для нужд животноводства иногда используются все продукты ферментации. В таких случаях культуральную жидкость упаривают в вакуум-аппаратах и сушат в сушилках распылительного типа.

В производстве дрожжей, бактериальных удобрений и средств для защиты растений полезным продуктом является клеточная масса микроорганизмов.

Для выделения биомассы используют сепараторы, осадительные центрифуги, фильтр-прессы, вакуум-фильтры или отстойники. Иногда биомассу осаждают добавлением электролитов ( $\text{FeCl}_3$ ), надосадочную жидкость декантируют. После центрифугирования биомассу получают в виде густой жидкости или пасты 75—90%-ной влажности. Клеточную массу промывают, фильтруют, сушат, гидролизуют, экстрагируют из нее нужный продукт и т. д. Если активное вещество находится в растворе, то биомассу используют после отделения как побочный продукт, а нужное вещество выделяют из раствора различными химическими или физическими методами:

- 1) отгонка спиртов и органических растворителей;
- 2) осаждение кислот в виде солей;
- 3) выделение аминокислот с помощью ионитов, с последующей элюцией, упариванием элюата и кристаллизацией;
- 4) антибиотики выделяют, осаждая в виде малорастворимых солей из водного раствора, где они предварительно максимально концентрируются путем экстракции или ионообменным путем, а также высушивая водные растворы лиофилизацией или в сушилках распылительного типа.

Допустимо производство нескольких препаратов микробного происхождения на одном предприятии и даже в одном цехе только в том случае, если они не являются антагонистами. Надо избегать соседства с производством культур, образующих споры, если продуцент основного вещества является беспоровым микроорганизмом. При организации производства надо изолировать отдел обработки сухой активной биомассы во избежание ее распространения в виде пыли. На предприятиях микробиологического синтеза можно обеспечить высокие экономические показатели и выпуск продукции высокого качества только при наличии отличных санитарных условий и высокой культуры производства. Регулярная чистка аппаратуры и коммуникаций, стерилизация, светлые тона окраски стен и аппаратуры, гладкие поверхности, кондиционированный воздух, безукоризненно чистая спецодежда рабочих — таким должно быть современное предприятие микробиологического синтеза.



## Глава V

# ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОБНОЙ БИОМАССЫ

## ХЛЕБОПЕКАРНЫЕ ДРОЖЖИ

В производстве хлебопекарных дрожжей используют специально отобранные расы *Sacch. cerevisiae* 14, 21, Томская 7 и др. (см. приложение 4). При отборе культуры принимают во внимание способность дрожжей сбраживать тесто, т.е. они должны обладать хорошей подъемной силой и ферментативной активностью, хорошо расти на мелассной среде в условиях глубинной ферментации и давать высокий выход биомассы. Клетки дрожжей должны легко отделяться от культуральной жидкости сепарированием или фильтрацией и хорошо сохраняться в прессованном виде. Подъемную силу дрожжей выражают в минутах, в течение которых определенное количество дрожжей развиваясь в определенном количестве теста, увеличивает его объем на предусмотренную стандартом величину. Для хороших дрожжей подъемная сила не должна превышать 75 мин, зимазная активность — 30—40 мин, мальтазная активность — 50—80 мин.

Зимазную и мальтазную активность определяют по методу Елецкого, в основе которого лежит выделение определенного объема газа в сахарозной и мальтозной среде.

Размеры клеток хлебопекарных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* равны  $(3 \div 8) \times (6 \div 14)$  мкм. Форма их круглая или овальная (см. приложение 4).

Хлебопекарные дрожжи обладают и бродильной активностью, но чтобы достигнуть использования сахаров только для образования биомассы, спиртовое брожение надо ограничить всеми доступными средствами. Это достигается интенсивной аэрацией среды, а также поддержанием низкой концентрации сахара в ней (0,5—1,5%). При высокой концентрации сахаров имеет место катаболитная репрессия ферментов цикла Кребса и переключение энергетического метаболизма преимущественно на брожение. Чтобы избежать этого, сахар в среду подают непрерывно с постоянной или возрастающей скоростью притока.

Чтобы предотвратить чрезмерное размножение побочной микрофлоры, особенно так называемых диких дрожжей, удельная скорость роста которых выше, чем у хлебопекарных дрожжей, процесс ферментации обычно ведут по периодической схеме в течение 10—20 ч.

Технология получения дрожжей имеет много различных вариантов.



## Получение дрожжей из мелассы

Питательную среду для выращивания хлебопекарных дрожжей готовят из мелассы с добавками солей фосфора и азота, исходя из того, что готовая продукция должна содержать 6—7% азота и 3,6—4,4%  $P_2O_5$  в пересчете на сухое вещество.

Мелассу разбавляют водой в соотношении 1:1—1:4, подкисляют серной кислотой до pH 5,0, осветляют центрифугированием в специальных кларификаторах. При центрифугировании из среды удаляются вещества, которые могут ухудшать цвет и качество дрожжей. Такой 20—45%-ный раствор мелассы перекачивают в приточные мерные резервуары. Водные растворы солей (обычно в соотношении 1:10) перекачивают в отдельные приточные емкости.

В размножении культуры дрожжей различают следующие стадии: *лабораторную; чистой культуры; естественно чистой культуры; товарных дрожжей.*

В лаборатории размножение дрожжевой культуры идет через три этапа в 10—12%-ной солодовой среде при использовании колб на 100, 1000, 8000 мл, в которых выращивание дрожжей длится по 24 ч. Границы оптимальной температуры 28—32°C, реакция среды pH 4,5—5,5.

Для ограничения бактериальной инфекции в начальных стадиях стараются использовать более низкую реакцию среды — pH 4,3—4,6. Допускается также спиртовое брожение.

В стадии чистой культуры (ЧК) дрожжи размножаются в двух герметических аппаратах на 12%-ной мелассной среде, обогащенной солодовым экстрактом и двузамещенным фосфатом аммония. Емкость первого аппарата 80—100 л, второго — 800—820 л. Среда периодически аэрируется. Длительность ферментации 10—20 ч. Получают 2—4 кг дрожжей в пересчете на сухое вещество.

В следующей стадии естественно чистой культуры (ЕЧК) получают посевной материал на 7—8%-ной мелассной среде в условиях непрерывной, на первых стадиях менее интенсивной аэрации, а в конце на единицу объема жидкости за 1 мин вводят уже единицу объема воздуха. На последних стадиях дрожжи сепарируют и прессуют. Полученный посевной материал, который называют *технической чистой культурой*, хранят при 4°C и используют в качестве посевного материала при производстве товарных дрожжей. С целью улучшения качества товарных дрожжей, уменьшения количества сопутствующей бактериальной микрофлоры желателен ЕЧК перед засевом подвергнуть кислотной обработке. Для этого прессованную ЕЧК суспендируют в воде (1:1) и добавляют 100%-ную молочную кислоту в коли-



честве 2% от массы дрожжей, перемешивают и выдерживают 1 ч. Для этих же целей можно использовать фуразолидон (0,05% к объему дрожжевой суспензии) при выдержке в течение 1 ч.

Товарные дрожжи обычно получают в три этапа. Сначала размножают первый посевной материал (задаточные дрожжи), затем вторые задаточные дрожжи и из них получают товарные дрожжи. Получение первых задаточных дрожжей идет без притока среды; длительность процесса 6—7 ч. На втором этапе стремятся полностью исключить спиртовое брожение, поэтому дрожжи выращивают в условиях очень интенсивной аэрации, лимитируя концентрацию сахара в среде, по проточному методу культивирования. Чаще всего длительность этого этапа 10—12 ч. Последний этап производства товарных дрожжей длится 10—24 ч.

Рассмотрим подробно последний этап выращивания дрожжей, который длится 12 ч. В чистый аппарат вводят 70—80% теплой воды от необходимого для конечного разведения мелассы (1:17—1:30) количества, добавляют 10% мелассы и раствора солей, устанавливают оптимальные для культуры дрожжей pH среды, температуру и начинают умеренную аэрацию (1:1 по объему). В такую среду вводят посевной материал, т. е. вторые задаточные дрожжи — 8—15% по сухой массе от количества усваиваемого сахара. В течение первого часа среду не добавляют, но в последующие 10 ч ее вводят непрерывным потоком в количестве 5; 6; 7,2; 8,2; 9,2; 10,2; 11,4; 12,8; 11; 9% за час от общего количества среды.

Аэрация в течение всего времени ферментации также меняется. В первый и последний час культивирования она меньше (1:1), а в период интенсивного размножения дрожжей достигает 1,5—2,0 объема воздуха на 1 ед. объема среды в минуту.

В таких условиях культура дрожжей проходит все фазы развития и соответственно этому меняется и технологический режим. Следовательно, в начальной лаг-фазе потребление кислорода воздуха меньше. В стационарной фазе надо выдержать культуру до ее полного созревания, т. е. до прекращения интенсивного почкования.

Во время ферментации незначительно возрастает концентрация среды (от 0,9 до 2,2% по сахаромеру) и титруемая кислота (от 0,3 до 0,8 мл 1 н. раствора кислоты на 100 мл раствора). В таких условиях выход прессованных дрожжей составляет 150%, сухой биомассы — 37,5% от количества использованного сахара.

Для обеспечения высоких выходов дрожжевой биомассы важно обеспечить в среде не только оптимальные концентрации сахара, азота, фосфора и других элементов, но и витаминов группы В, в первую очередь биотина, иногда пантотената кальция. Если



в мелассе этих веществ недостаточно, добавляют кукурузный экстракт, вытяжку из солодовых ростков и другие добавки.

Разработаны различные методы интенсификации процесса ферментации. На некоторых заводах для продления процесса ферментации последней стадии практикуют после 6—7-го часа ферментации ежечасовой отбор культуральной жидкости объемом 15—30% и добавление такого же количества свежей среды. Для прекращения процесса размножения отобранную культуральную жидкость выдерживают 1—2 ч в резервуарах и затем сепарируют.

Для повышения концентрации клеток дрожжей в культуральной жидкости иногда практикуют возвращение сепарированных дрожжей в ферментатор (возвратная сепарация).

В производстве хлебопекарных дрожжей пытаются использовать метод непрерывной ферментации, но быстрое развитие побочной микрофлоры в этих условиях не дает возможности вести процесс дольше 4—6 сут.

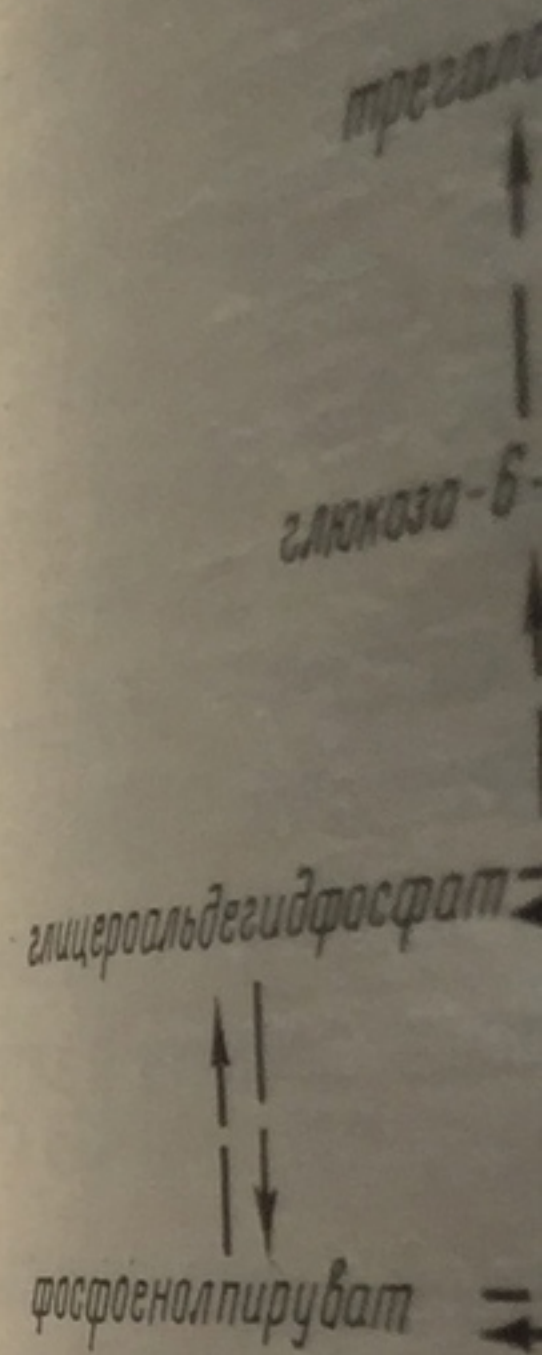
Биомассу дрожжей отделяют от культуральной жидкости, используя сепараторы, производительность которых 16—35 м<sup>3</sup>/ч. Сепарирование обычно идет в три этапа, при двукратной промывке суспензии клеток водой для удаления остатков среды, бактерий и примесей. Получают концентрат дрожжей, содержащий 80—120 г/л сухой биомассы. Его охлаждают до 8—10°C, фильтруют на вакуум-фильтрах или фильтр-прессах и получают дрожжевую пасту с 70—75%-ной влажностью. После кондиционирования пасты водой до стандартной (75%) влажности, дрожжи формируют в плитки массой 50, 100, 500, 1000 г и упаковывают. Хранят прессованные дрожжи при температуре 0—4°C до 10 сут. Хлебопекарные дрожжи можно высушивать при температуре 30—40°C до влажности 8% и хранить до 6 мес.

### Выращивание дрожжей на этанольной среде

Ряд культур дрожжей, в том числе *Saccharomyces*, в условиях недостаточного обеспечения среды кислородом и при наличии углеводов получают энергию путем анаэробного расщепления сахаров (гликолиз); при этом образуется этанол. Как только в среде появляется кислород, клетки дрожжей сразу переключаются на энергетически более выгодный аэробный метаболизм (Пастеровский эффект) и способны метаболизировать не только глюкозу, но и накопившийся в среде этанол. Усваивать этанол дрожжи могут благодаря наличию в их клетках фермента алкогольдегидрогеназы (рис. 41).

Выращивание дрожжей на этанольной среде представляет интерес в связи с тем, что химическая промышленность выраба-

тывает этанол на осн  
нол сравнительно деше  
нужд микробиологичес  
ся в связи с переводом  
тель этанола) на други  
жит мало вредных



ацетил-КоА

алкогольдегид-  
рогеназа

этанол

Рис. 41. Химизм

зовать выращи  
кормовых, но и д  
сырья для микро  
качества. В это  
лассы, гидролиз  
Особенности  
этанольной сре



тывает этанол на основе гидратации этилена. Синтетический этанол сравнительно дешевый источник углерода, его ресурсы для нужд микробиологического синтеза в будущем могут увеличиться в связи с переводом производства каучука (основной потребитель этанола) на другие виды сырья. Технический этанол содержит мало вредных примесей, что дает возможность исполь-

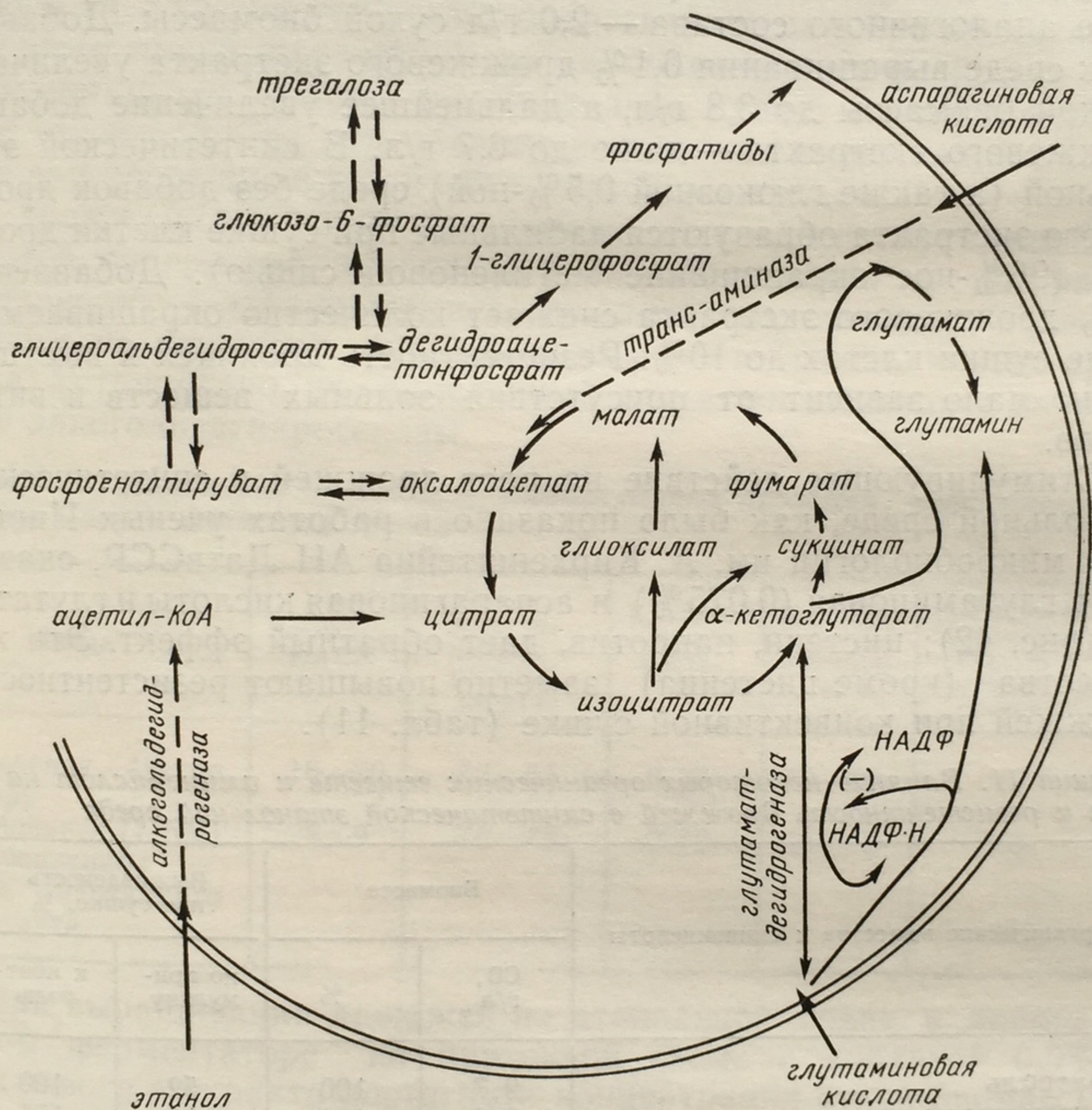


Рис. 41. Химизм использования этанола дрожжевой клеткой

зовать выращенную на нем биомассу дрожжей не только для кормовых, но и для пищевых нужд. Большую роль в выборе сырья для микробиологического синтеза играет стабильность его качества. В этом отношении этанол выгодно отличается от мелассы, гидролизатов древесины, отходов промышленности.

Особенности роста дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* 14 на этанольной среде можно показать на основе работ, проводимых



в Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР. Состав среды выращивания следующий (г/л):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  — 3,3;  $\text{MgSO}_4$  — 0,7;  $\text{NaCl}$  — 0,5;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 1,0;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,13; этанол 1,5% об. В качестве посевного материала использовали 48-часовую культуру дрожжей. При культивировании в колбах на качалке (рН от 4,5 до 5,5; температура 30° С) за 120 ч получили 1,9 г/л сухой биомассы дрожжей; на синтетической глюкозной среде аналогичного состава — 2,0 г/л сухой биомассы. Добавление к среде выращивания 0,1% дрожжевого экстракта увеличило урожай биомассы до 3,8 г/л, а дальнейшее увеличение добавок дрожжевого экстракта — даже до 6,7 г/л. В синтетической этанольной (а также глюкозной 0,5%-ной) среде без добавок дрожжевого экстракта образуются лабильные при сушке клетки дрожжей (96%-ное окрашивание метиленовой синью). Добавление 0,1% дрожжевого экстракта снижает количество окрашиваемых после сушки клеток до 10%. Резистентность дрожжей к высушиванию мало зависит от присутствия зольных веществ и витаминов.

Стимулирующее действие на рост дрожжей в синтетической этанольной среде, как было показано в работах ученых Института микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР, оказывают глутаминовая (0,075%) и аспарагиновая кислоты и глутатион (рис. 42); цистеин, напротив, дает обратный эффект. Эти же вещества (кроме цистеина) заметно повышают резистентность дрожжей при конвективной сушке (табл. 11).

Таблица 11. Влияние некоторых органических веществ и аминокислот на рост и резистентность дрожжей в синтетической этанольной среде

Органические вещества и аминокислоты	Биомасса		Выживаемость при сушке, %	
	СВ, г/л	%	по при- мулину	к конт- ролю
Контроль	2,7	100	52	100
Глутаминовая кислота	3,9	144	80	154
$\alpha$ -Кетоглутаровая кислота	2,3	85	51	98
Яблочная кислота	2,6	97	52	100
Пировиноградная кислота	1,7	63	11	21
Глутатион (восстановленный)	До 3,5	До 130	64	123
Глутаминовая кислота + глицин + цистин	0,6	22	25	48
Глицин	2,1	78	46	89
Цистеин	0,7	26	4	8
Аспарагиновая кислота	3,2	118	65	124
Аланин	1,7	63	45	86
Метионин	1,7	63	45	85



Установлено, что добавление к синтетической этанольной среде глутаминовой кислоты повышает активность малатдегидрогеназы на 140%, а глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы на 90%. В то же время снижается активность НАДФ-зависимой глутаматдегидрогеназы. Это позволяет предположить, что экзогенная глутаминовая кислота не включается в цикл Кребса через  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту, но оказывает оберегающее влияние на метаболиты этого цикла, расходуясь на анаболические цели.

Глутаминовая кислота положительно влияет на глюконеогенез, в том числе и на образование пентоз, что имеет важное значение при росте дрожжей на безуглеводных средах.

У дрожжей, выросших на этанольной среде с глутаминовой кислотой, содержание трегалозы повышается почти в два раза по сравнению с этанольными дрожжами; это, очевидно, является одним из факторов, повышающих резистентность клеток при сушке. Установлено, что окисленный глутатион повышает активность алкогольдегидрогеназы.

Таблица 12. Некоторые показатели хлебопекарных дрожжей, выращенных на этанольной и мелассной средах

Среда	Биомасса, г/л СВ	Выход, % от используемого субстрата	Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	Выживаемость при сушке, %	Активность выделения CO <sub>2</sub> , % к прессованным дрожжам
Мелассная, 4% по сахару	18—20	50—53	0,23	75—80	87
Этанольная (1,5%) с добавлением 0,5% дрожжевого экстракта	8—9	70—75	0,12	55—65	62

При выращивании дрожжей на этанольной среде в лабораторном ферментаторе по проточной схеме с добавкой 0,5% дрожжевого экстракта достигнута концентрация сухой биомассы 8—9 г/л при выходе 70—75% от использованного субстрата. Полученные дрожжи имеют несколько пониженную по сравнению с дрожжами, выращенными на мелассе, активность выделения углекислого газа (т. е. бродильную активность), кроме того, этанольные дрожжи менее устойчивы при сушке (табл. 12).

#### Автолизат дрожжей

Ценные компоненты биомассы дрожжей — аминокислоты белков, витамины, основания нуклеиновых кислот и др. — могут быть использованы для приготовления натуральных и полусин-



тетических сред, применяемых как в лабораториях, так и для нужд промышленного микробиологического синтеза. Однако большинство ценных компонентов клетки находится в виде различных белковых комплексов, поэтому добавление к среде нативных дрожжей не дает эффекта.

Гидролиз белков можно провести ферментативно или используя кислоты и щелочи. При щелочном гидролизе белков возможно разрушение некоторых аминокислот или их изомеризация в D-формы, которые в биологических системах используются не полностью. Надо отметить, что в щелочной среде инактивируются некоторые витамины. При кислотном гидролизе белков разрушаются незаменимая аминокислота — триптофан и некоторые витамины группы В. Гидролиз белков можно осуществить, используя препараты протеолитических ферментов. Кроме того, в самих клетках дрожжей есть активные протеолитические ферменты, которые при определенных условиях в среде могут разрушать клеточные белки (автолиз).

Для приготовления дрожжевого автолизата сначала получают дрожжевую пасту влажностью 65—76%. В реакторе из дрожжевой пасты и воды (50°C) в соотношении 1:1 готовят суспензию, которую выдерживают 1—2 сут при температуре 45°C. В это время идет автолиз клеток. Активировать процесс автолиза можно добавлением фосфатов, заменяя воду вытяжкой суперфосфата или добавляя к суспензии дрожжей в воде 2,5% хлорида натрия (по сухой массе дрожжей).

Полученную жидкую массу подкисляют, добавляя на каждые 100 л автолизата 0,25 л концентрированной серной кислоты, которую предварительно разбавляют в 4 раза. После этого автолизат кипятят 15—20 мин. После охлаждения он готов к употреблению. Кроме белкового гидролиза в дрожжевом автолизате могут идти и другие побочные процессы — декарбоксилирование кетокислот, образование аминокислот из кетокислот, спиртовое брожение и др. После автолиза 10—12% (по сухой массе) суспензии дрожжей в течение 24 ч при 45°C в жидкой фракции автолизата содержится до 5% сухих веществ. Из общего количества азота фильтрата 50% приходится на аминный азот аминокислот тирозина, триптофана, метионина, цистеина, аргинина, гистидина и др. Кроме того, в фильтрат переходят витамины группы В — тиамин, витамин РР и др. Добавки жидкого автолизата к питательным средам определяются экспериментально.

Выпаривая в вакууме и затем лиофилизируя или высушивая в распылительной сушилке жидкий дрожжевой автолизат, можно получить сухой препарат, который удобно хранить. Особо обработанный автолизат можно использовать в медицине при парентеральном питании как источник аминокислот и витаминов.



## КОРМОВЫЕ ДРОЖЖИ

В зависимости от природы перерабатываемого сырья для производства кормовых дрожжей чаще всего используют культуры родов *Candida* (см. приложение 4), *Trichosporon*. Выбирая культуру, надо следить, чтобы скорость ее роста в соответствующей среде была максимальной, в состав биомассы входило бы много белков, витаминов, чтобы культура в определенных условиях была вирулентной (могла конкурировать с сопутствующей микрофлорой).

Кормовые дрожжи получают из доступных, дешевых, содержащих углерод видов сырья, которые можно разделить на несколько групп:

1) углеводосодержащее сырье (гидролизаты древесных и сельскохозяйственных отходов, меласса, сульфитный щелок целлюлозной промышленности);

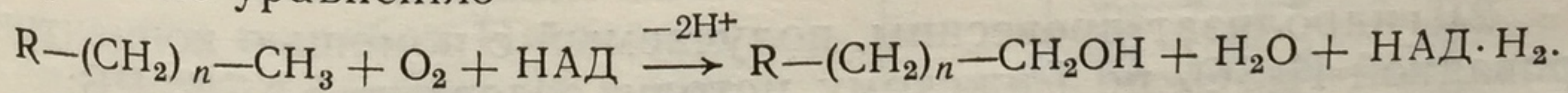
2) природные и синтетические субстраты, содержащие органические кислоты, спирты и другие окисленные соединения углерода (отходы спиртовой промышленности — барда, отходы производства синтетических моющих веществ и др.);

3) углеводороды (нефть, парафины, природные газы).

Еще русский ученый В. Таусон доказал, что многие бактерии и грибы могут использовать углеводороды, например гидролизующие жиры микробактерии используют углерод гексана, октана и парафина. Он доказал, что в ряде случаев выход биомассы микроорганизмов при использовании парафина составляет 50—70% в пересчете на сухие вещества.

Механизм, обеспечивающий проникновение углеводородов в клетку, еще окончательно не изучен. В клетках дрожжей липидная фракция клеточной стенки, надо думать, вследствие своего гидрофобного характера служит главной системой транспорта углеводородов из окружающей среды до цитоплазматической мембраны. Установлено, что парафины при контакте с клеткой быстро диффундируют через клеточную стенку по градиенту концентрации.

Попав в клетку, парафины окисляются до соответствующих спиртов по уравнению

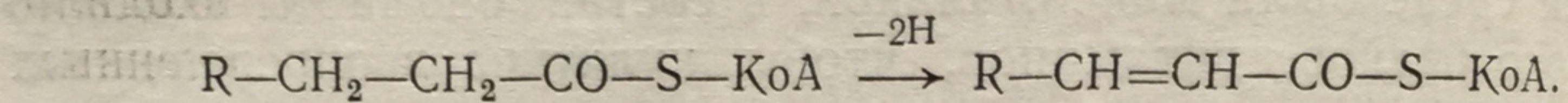


Спирты в присутствии алкогольдегидрогеназы далее окисляются до альдегидов, которые в свою очередь под влиянием альдегиддегидрогеназы окисляются до соответствующих кислот.

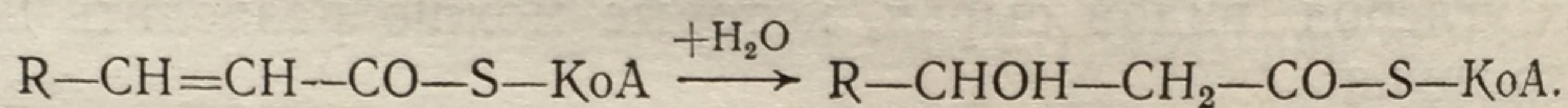
Дальнейшее превращение кислот идет по пути  $\beta$ -окисления. Углеродная цепь постепенно с каждым циклом окисления укорачивается на два атома углерода в результате окисления радика-



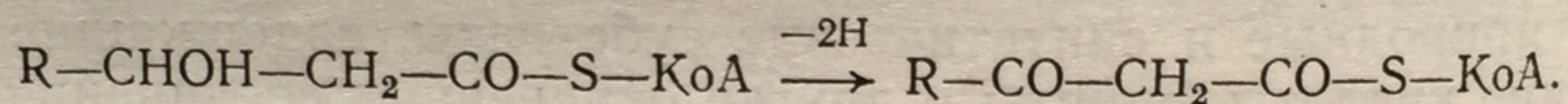
ла—находящегося в  $\beta$ -положении по отношению к карбоксильной группе. Вначале при участии ацетилкофермента А образуются соответствующие ацетил-КоА производные кислот, при окислении которых под действием фермента ацетилгидрогеназы образуются соединения с двойной связью при втором углеродном атоме:



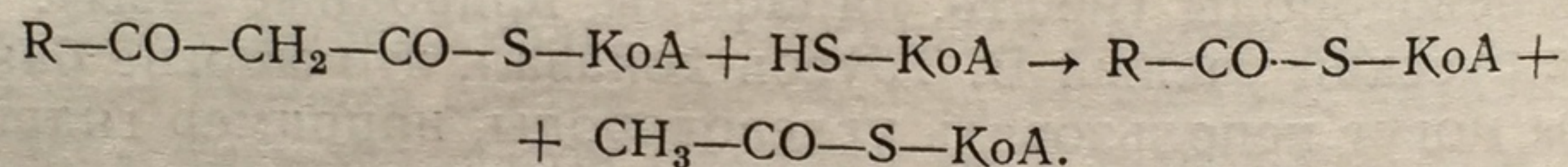
К ненасыщенному соединению под действием фермента эноилгидратазы присоединяется вода:



Под действием  $\beta$ -оксиацетилдегидрогеназы  $\beta$ -оксикислота восстанавливается до кетокислоты:



Процесс  $\beta$ -окисления заканчивается при участии  $\beta$ -кетацилтиолазы:



Таким образом, в результате этих реакций образуется ацетил-КоА и содержащий на два атома углерода меньше, чем исходная жирная кислота, КоА-эфир жирной кислоты, который повторно вовлекается в цикл  $\beta$ -окисления. Ацетил-КоА после включения ацетильного радикала в цикл Кребса возвращается в виде кофермента А в цикл реакций  $\beta$ -окисления, где играет роль катализатора.

Используемые в производстве дрожжей питательные среды содержат источники углерода различной концентрации:

1) гидролизат древесины, получаемый при помощи слабых кислот, содержит 2—3,5% редуцирующих веществ (РВ). Если предварительно получают спирт, то содержание РВ уменьшается до 0,5—0,7%;

2) гидролизат древесины, получаемый с помощью концентрированной  $\text{H}_2\text{SO}_4$  по Рижскому методу, содержит 5—7% РВ;

3) сульфитный щелок после получения целлюлозы содержит 2,6—2,8% РВ, а после получения спирта 0,5—1,1% РВ;

4) меласно-спиртовая барда содержит 5—7% сухих веществ, из которых 2—3% используют дрожжи;

5) жидкие парафины в средах содержатся в концентрации 0,8—1,5%.



При приготовлении питательной среды количество углерода определяют, исходя из нормативов выхода биомассы. Доказано, что из 100 кг глюкозы можно получить 49—59 кг сухих дрожжей, т. е. в среднем 50 кг дрожжей на 100 кг сахара, следовательно, выход 50%. Из уксусной кислоты и ее солей выход дрожжей составляет 33—35%.

Количество азота в питательной среде определяют, исходя из ожидаемого количества азота в биомассе. Если намечено получить 100 кг дрожжей с 50%-ным содержанием сырого протеина, то для образования этой биомассы необходимо

$$\frac{100 \cdot 50}{100 \cdot 6,25} = 8,0 \text{ кг азота.}$$

Если с посевным материалом в данной стадии вносится 5% биомассы, то необходимо вычесть внесенное количество азота, т. е.

$$\frac{5 \cdot 50}{100 \cdot 6,25} = 0,4 \text{ кг азота.}$$

Необходимо учитывать, что необходимое количество азота можно ввести вместе с источником углерода, например меласой, где содержится около 0,5% используемого дрожжами азота. Принимают, что коэффициент использования азота из среды равен 0,95.

Количество фосфора в среде определяют так же, как и азот. В среднем в дрожжах имеется 3,2—5,2%  $P_2O_5$  (по сухой массе). Коэффициент использования фосфора в среде 0,75.

Выращивание культуры дрожжей начинается в лаборатории на 8—10%-ной солодовой питательной среде сначала в 50—100-миллилитровых колбах, затем в колбах Пастера и Карлсберга в течение 24 ч при 30°C и pH 4,5—5,5. Затем культуру размножают в инокуляторах до тех пор, пока получат посевной материал в количестве 10% от имеющегося количества сахара в рабочем объеме

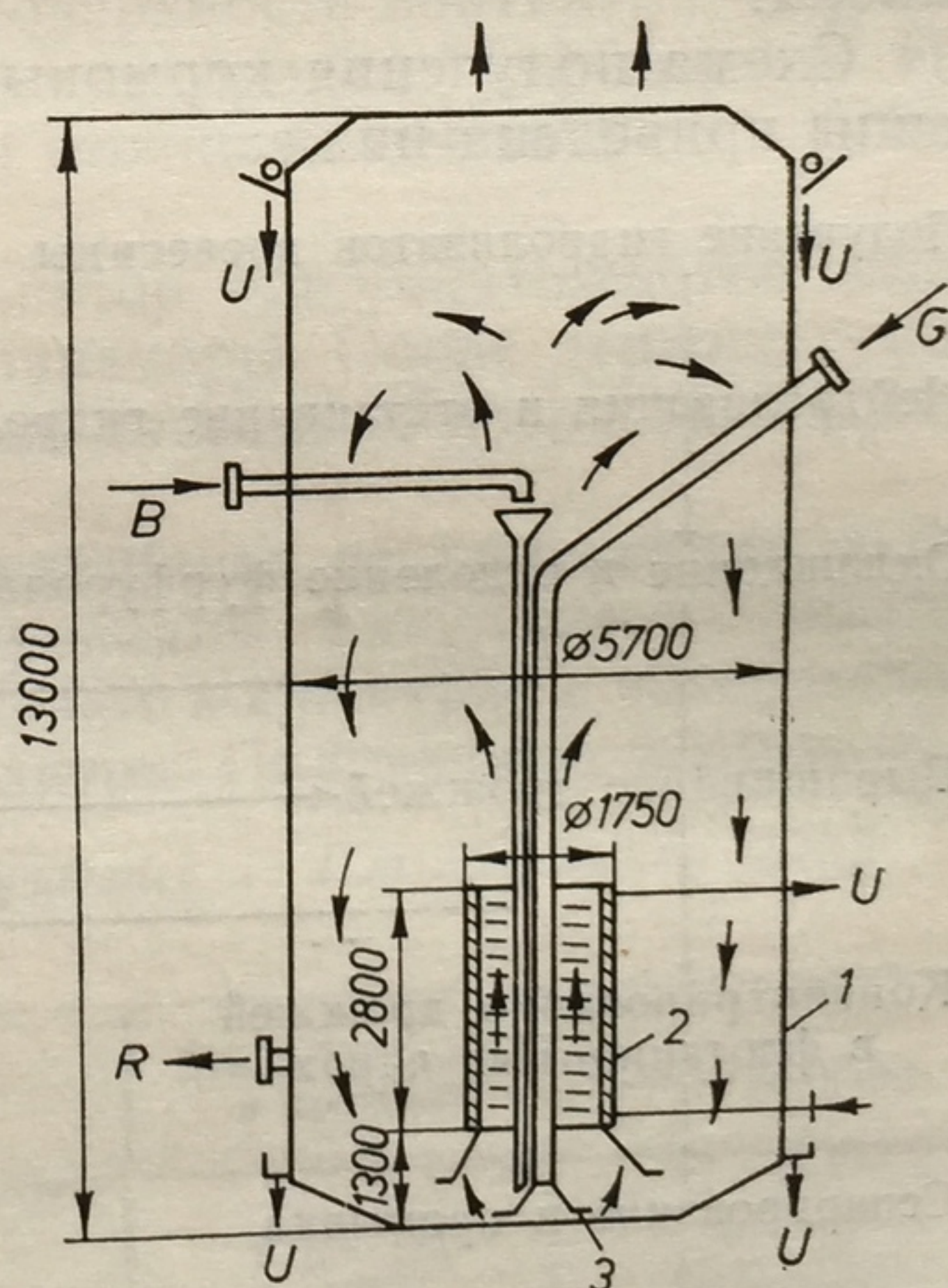


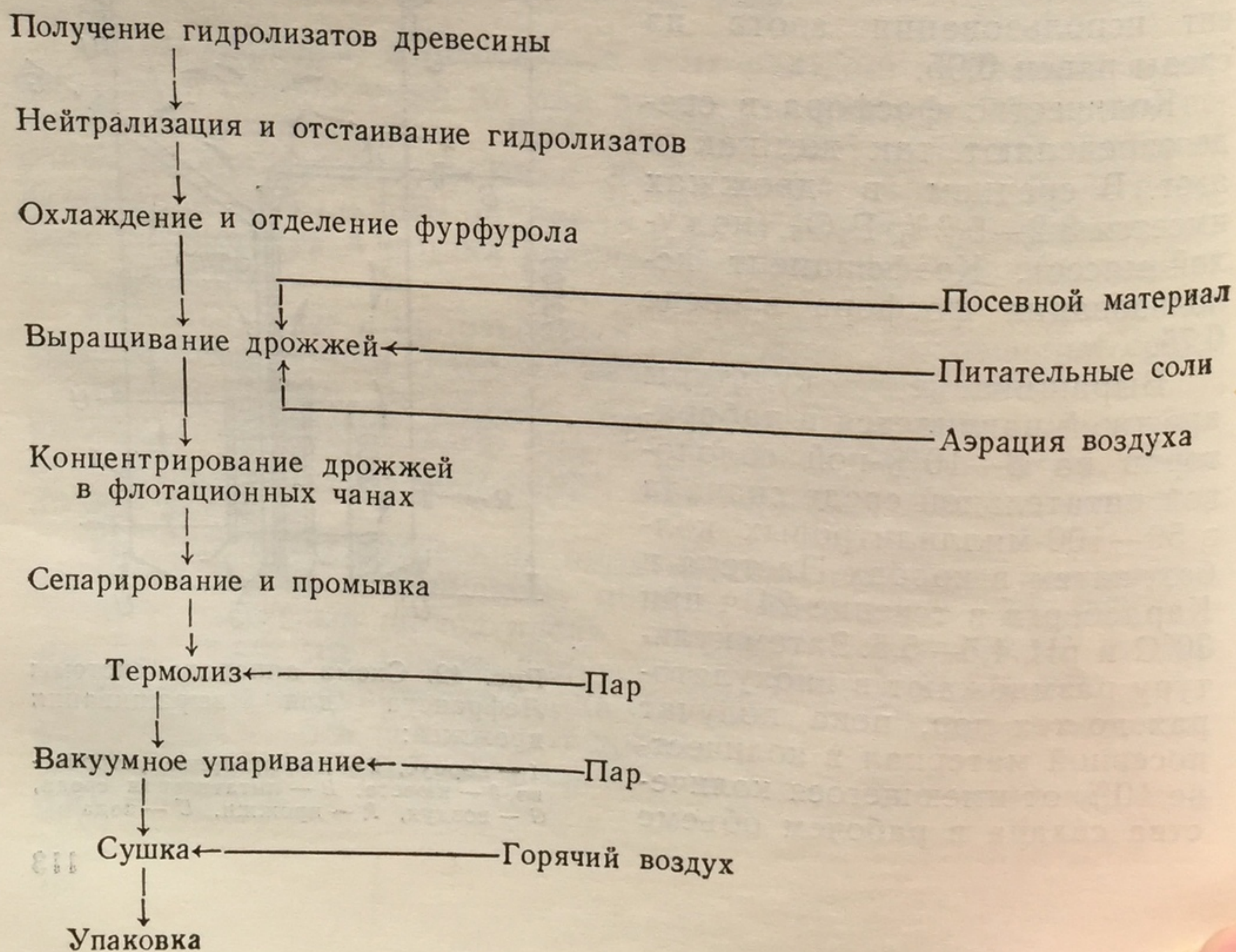
Рис. 42. Схема аппарата системы Лефрансуа для выращивания дрожжей:

1 — корпус, 2 — диффузорное устройство, 3 — кювета, B — питательная среда, G — воздух, R — дрожжи, U — вода



производственного аппарата. В инокуляторах так же, как и в лабораторной стадии, выращивание дрожжей ведется в стерильных условиях, но в них уже применяется интенсивная аэрация (30—50 м<sup>3</sup> воздуха в час на 1 м<sup>2</sup> среды). Основная ферментация в производстве кормовых дрожжей идет по непрерывному методу культивирования. Широко используются дрожжерастильные аппараты типа Лефрансуа, в которых среда и культура дрожжей находятся во вспененном состоянии. На рис. 42 приведен один из таких аппаратов. Высота его 13 м, диаметр 7 м и объем 320 м<sup>3</sup>. Иногда дрожжерастильные аппараты устанавливают под открытым небом. Аппараты моют, стерилизуют, затем наполняют средой (гидролизат древесины, парафины, сульфитный щелок с добавками солей), устанавливают температуру 30°C, pH 5,0—5,2 и аэрируют. Затем вносят посевной материал и ведут ферментацию до тех пор, пока концентрация сухих веществ дрожжей не достигнет 10—15 г/л (это возможно при содержании РВ в среде, равном 2,5%). Затем непрерывным потоком подают питательную среду с такой скоростью, чтобы весь рабочий объем аппарата обменялся в течение 4—8 ч. Это значит, что коэффициент разбавления  $D$  равен 0,12—0,25 ч<sup>-1</sup>. Одновременно с такой же скоростью готовую суспензию дрожжей удаляют из аппарата для сепарирования с целью выделения и концентрирования биомассы.

Схема получения кормовых дрожжей из гидролизатов древесины приведена ниже:



Скорость роста дрожжей  
такая, что для полного  
обмена 1—2 ч, но в  
среду идет 3—5 ч.  
Удельная скорость  
культуры дрожжей:  
1) для *Candida utilis*  
при  $\mu = 0,42$  ч<sup>-1</sup>;  
2) для *Candida utilis*  
при  $\mu = 0,37$  ч<sup>-1</sup>;  
3) для *Candida utilis*  
при  $\mu = 0,115$  ч<sup>-1</sup>;  
4) для *Rhodotorula*  
при  $\mu = 0,121$  ч<sup>-1</sup>;  
5) для *Candida int*  
при  $\mu = 0,10$  ч<sup>-1</sup>.  
Культуральная жи  
30—40% объема, оста  
состоянии воздух име  
ми, поэтому снабжен  
аппарата емкостью 32  
дрожжей.  
Из ферментатора  
суспензию дрожжей  
рирования concentra  
5 раз.  
В практике испо  
концентрат после п  
водой и сепарируют  
ем 100—200 г сухи  
Таблица 13. Количес  
древесины

Продукт	Количество, кг
Этиловый спирт, л	10
Дрожжи (влажн.)	10
Метанол, кг	10
Сивушные масла, кг	10
Фурфурол (94%-ный)	10
Лигнин (абс. сухой)	10
Углекислота (жидк.)	10
Гипс, кг	10



Скорость роста дрожжей зависит от свойств культуры и состава среды, а также от режима ферментации. Теоретически считают, что для полного развития клеточного цикла дрожжей необходимо 1—2 ч, но в производственных условиях развитие цикла идет 3—5 ч.

Удельная скорость роста  $\mu$  зависит от источника углерода и культуры дрожжей:

1) для *Candida utilis* в глюкозной среде с дрожжевым автолизатом  $\mu = 0,42 \text{ ч}^{-1}$ ;

2) для *Candida utilis* в глюкозной среде без добавок автолизата  $\mu = 0,37 \text{ ч}^{-1}$ ;

3) для *Candida utilis* в ксилозной среде  $\mu = 0,175 \text{ ч}^{-1}$ ;

4) для *Rhodotorula gracilis* в мелассной барде  $\mu = 0,091 \div 0,115 \text{ ч}^{-1}$ ;

5) для *Candida intermedia* в мелассной барде  $\mu = 0,01 \div 0,121 \text{ ч}^{-1}$ ;

6) для *Candida tropicalis* в жидкой парафиновой среде  $\mu = 0,10 \div 0,12 \text{ ч}^{-1}$ .

Культуральная жидкость в аппаратах Лефрансуа занимает 30—40% объема, остальную часть занимает пена. В вспененном состоянии воздух имеет большую поверхность контакта с клетками, поэтому снабжение культуры кислородом улучшается. Из аппарата емкостью 320 м<sup>3</sup> за сутки можно получить 1—5 т сухих дрожжей.

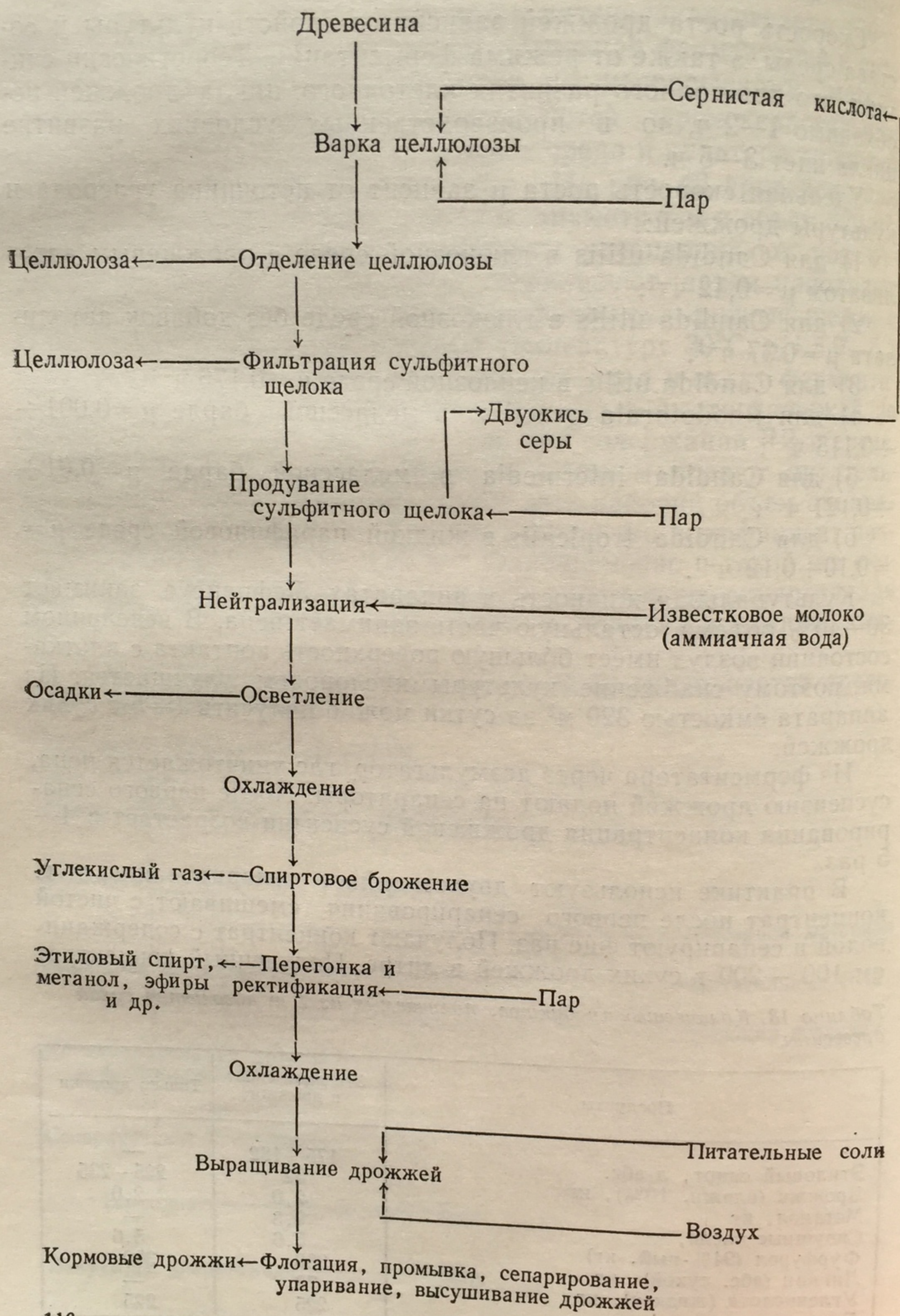
Из ферментатора через деэмульгатор, где уничтожается пена, суспензию дрожжей подают на сепараторы. После первого сепарирования концентрация дрожжевой суспензии возрастает в 4—5 раз.

В практике используют двухстадийное сепарирование, т. е. концентрат после первого сепарирования смешивают с чистой водой и сепарируют еще раз. Получают концентрат с содержанием 100—200 г сухих дрожжей в литре. Полученный концентрат

Таблица 13. Количество продуктов, получаемых из 1 т абсолютно сухой древесины

Продукты	Этиловый спирт и дрожжи	Только дрожжи
Этиловый спирт, л абс.	175—182	—
Дрожжи (влажн. 10%), кг	32	225—235
Метанол, кг	2,0	2,0
Сивушные масла, кг	0,3	—
Фурфурол (94%-ный, кг)	5,6	5,6
Лигнин (абс. сухой), кг	380	380
Углекислота (жидкая), кг	70	—
Гипс, кг	225	225





температуру паром и, если  
ультрафиолетовыми лучами,  
или инфракрасного типа,  
воздуха 350—400°C. Влажно  
сти до 12%, белков 4  
и в вакуумных аппаратах  
Экономически выгодной  
древесины. В настоящее время  
производства кормовых дрож  
вышенности, где из древе  
Схема комплексной перера  
Количество получаемых  
показано в табл. 1

КОРМ  
ЦЕЛЛ

Учитывая практически  
содержащего сырья и низ  
жительного времени веду  
по получению микробног  
рий и грибов, обладающи  
содержащих целлюлозу.  
ролиз целлюлозы на ф  
сахаривания с выращи  
Против использования  
жей и бактерий имеетс  
высоким содержанием  
держат до 12% нуклеи  
рии — до 16% (допуст  
или человека составля  
не животных таких к  
и др. В то же время в  
содержится 1,5—2,8%  
жей разрушается в о  
белок не сбалансир  
Среди дрожжей мал  
всего сказанного вы  
может использовать  
средах. Необходим  
гидролиза древеси



термолизуют паром и, если надо получить витамин D, облучают ультрафиолетовыми лучами. После этого сушат обычно в сушилках распылительного типа, в которых температура входящего воздуха 350—400°C. Влажность сухих дрожжей 5—8%, содержание золы до 12%, белков 45—50%. В некоторых технологических схемах после сепарирования дрожжевой концентрат сгущают в вакуумных аппаратах до содержания сухих веществ 25%.

Экономически выгодной является комплексная переработка древесины. В настоящее время самая низкая себестоимость производства кормовых дрожжей достигнута в целлюлозной промышленности, где из древесины получают различные продукты. Схема комплексной переработки приведена ниже.

Количество получаемых продуктов из абсолютно сухой древесины показано в табл. 13.

### КОРМОВАЯ БИОМАССА ИЗ ЦЕЛЛЮЛОЗУСОДЕРЖАЩИХ СУБСТРАТОВ

Учитывая практически неограниченные ресурсы целлюлозусодержащего сырья и низкую его стоимость, в течение продолжительного времени ведутся научно-исследовательские работы по получению микробного белка путем культивирования бактерий и грибов, обладающих целлюлазной активностью, на средах, содержащих целлюлозу. Ставится цель заменить кислотный гидролиз целлюлозы на ферментативный и совместить операцию осахаривания с выращиванием продуцента белка.

Против использования для кормовых целей биомассы дрожжей и бактерий имеется ряд возражений, в частности в связи с высоким содержанием в ней нуклеиновых кислот. Дрожжи содержат до 12% нуклеиновых кислот, быстрорастущие бактерии — до 16% (допустимая норма нуклеиновых кислот в питании человека составляет 2 г в день). При разрушении в организме животных таких количеств нуклеиновых кислот образуется много нежелательных продуктов распада — мочевой кислоты и др. В то же время в грибах при тех же условиях выращивания содержится 1,5—2,8% нуклеиновых кислот. Кроме того, у дрожжей имеется толстая и прочная клеточная стенка, которая с трудом разрушается в организме животного и вследствие этого снижается доступность питательных веществ дрожжей. Дрожжевой белок не сбалансирован по серусодержащим аминокислотам. Среди дрожжей мало культур с целлюлазной активностью. Из всего сказанного выше ясно, что эта группа микроорганизмов не может использоваться для культивирования на целлюлозных средах. Необходимо также отметить, что дрожжи из продуктов гидролиза древесины могут усваивать только целлюлозу, геми-



целлюлозу и продукты их распада. От них выгодно отличаются грибы, которые могут использовать и другие продукты гидролиза древесины, например лигнин, давая при этом биомассы в 2 раза больше, чем дрожжи.

Поэтому многие авторы считают грибы самыми перспективными продуцентами белка на целлюлозных субстратах (опилки, солома, картофельная мезга, свекловичный жом, торф и др.). Выход биомассы грибов рода *Penicillium* составляет не менее 60% от используемого источника углерода, при этом их удается получить до 25 г/л. Нитевидная природа грибов позволяет легко отделить мицелий от культуральной жидкости путем фильтрации.

В качестве примера можно привести разработанный в Институте микробиологии АН БССР метод получения грибного белка на основе отходов картофелекрахмального производства. При работе по данному методу используется культура гриба *Penicillium digitatum* 24 П.

Питательную среду готовят на основе картофельного сока и мезги. На каждый кубический метр сока добавляют 20 кг мезги, 4,5 кг нитрата аммония, 4 кг однозамещенного фосфата калия и 0,5 кг сульфата магния. Оптимальный рН среды находится между 3 и 6, температура 29—31°C. Глубинная ферментация осуществляется при интенсивной аэрации. В течение первых 2 суток в среде увеличивается содержание сахаров, что является результатом действия ряда гидролитических ферментов — целлюлаз, амилаз и др. Однако они быстро используются на образование биомассы, и содержание сахара падает до 0,02—0,04%. Максимальное количество биомассы (около 20 г/л) образуется через 48 ч ферментации, но содержание аминокислот (пролина, метионина, триптофана) достигает максимума только на третьи сутки. Сухой концентрат культуры получают фильтрацией культуральной жидкости и высушиванием пасты мицелия. Биомасса гриба *Penicillium digitatum* 24 П, полученная в таких условиях, содержит (в %): сырой протеин ( $N \times 6,25$ ) — 59; белок — 43; клетчатку — 20,6; жир — 4,8; нуклеиновые кислоты — 1,65; сахара — 7,2; крахмал — 4,5; безазотистые вещества — 10,1; золу — 5,5.

При рациональном использовании культуральной жидкости после отделения мицелия из нее можно получить препараты гидролитических ферментов, например путем осаждения органическими растворителями. В состав таких ферментных препаратов входят пектиназа, целлюлаза, амилаза, и они могут быть использованы для приготовления соков и вина.

В Финляндии освоен процесс переработки целлюлозного щелока, содержащего моно-, полисахариды и уксусную кислоту, при помощи гриба *Penicillium*. Субстратом могут служить также отходы сахарной и картофелеперерабатывающей промыш-



ленности. Продукт под названием «Пекило» содержит 55—60% протеина.

В США разработан метод получения биомассы бактерий рода *Cellulomonas*, обладающих целлюлолитической активностью. Исходное сырье после измельчения обрабатывают 2—5%-ной щелочью с целью модификации целлюлозы.

После извлечения сахара и щелочной обработки стебли сахарного тростника загружают в ферментатор ( $3,8 \text{ кг/м}^3$ ), добавляют минеральные источники азота, фосфора, калия, устанавливают рН 6,0—7,8 и ведут ферментацию при  $34^\circ\text{C}$  в течение 96 ч. Содержание условного белка в сухом продукте достигает 60%. Стоимость продукта при определенной мощности завода близка к стоимости соевых бобов. В качестве сырья при производстве бактериальной биомассы могут служить отходы сельского и лесного хозяйства, а также городские бытовые воды.

Предложены также методы совместного симбиотического культивирования *Cellulomonas* и, например, дрожжей *Trichosporon*. Данные бактерии во время роста образуют ингибитор целлюлазы — целлобиозу, которую усваивают дрожжи. Совместное культивирование повышает выход биомассы в 2—4 раза.

Две культуры микроорганизмов применяют и на заводах по переработке картофеля.

После переработки картофеля на сухое картофельное пюре, картофельные консервы, сушеный картофель и другие продукты остаются содержащие полисахариды сточные воды. Они содержат до 3% сухого вещества. Существуют микробиологические методы очистки сточных вод при одновременной переработке отходов производства с целью получения биомассы. При использовании дрожжей *Candida utilis* совместно с *Endomycopsis fibuliger* удается снизить биологическую потребность кислорода стоков на 90—95%. Метод совместного культивирования этих двух организмов за рубежом получил название «Симба». Так как дрожжи *Endomycopsis fibuliger* продуцируют ферменты, которые гидролизуют полисахариды до моносахаридов, а *Candida utilis* обладает большой скоростью роста, представляется возможным достаточно полно использовать полисахаридные субстраты и получить биомассу, на 90—95% состоящую из клеток *Candida*. Питательную среду для выращивания этих культур обогащают азотом и фосфором, ферментация идет в аэробных условиях при температуре около  $30^\circ\text{C}$ , реакция среды слабокислая. Большое значение имеет правильное соотношение культур *Candida* и *Endomycopsis* в начале ферментации. Производительность аппаратуры зависит от состава среды. При обогащении отходов производства нестандартным картофелем с  $1 \text{ м}^3$  емкости получают по 2 кг биомассы в час. Содержание сырого протеина в такой био-



массе около 40%, выход от источника углерода составляет 44—52%. Высушенная биомасса имеет светло-желтый цвет и успешно используется как кормовая добавка к рационам свиней и цыплят.

### МИКРОБНАЯ БИОМАССА ИЗ ПРИРОДНОГО ГАЗА

Сырьем для получения биомассы микроорганизмов могут служить природные газы, содержащие метан. Метанооксиляющие бактерии родов *Mycobacterium*, *Pseudobacterium*, *Actinomyces*, *Chromobacterium*, *Brevibacterium*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, а также некоторые другие микроорганизмы, способные ассимилировать метан в качестве источника углерода. Отличительной чертой перечисленных микроорганизмов является способность синтезировать все клеточные компоненты из одноуглеродного соединения, каким является метан. При этом возможны два варианта усвоения метана: 1) автотрофный, с образованием углекислого газа из метана; 2) гетеротрофный, при последовательном окислении метана через спирт и альдегид.

При получении биомассы на природном газе (метане) возникает ряд трудностей:

1) низкая растворимость метана в культуральной жидкости (максимум 0,02 г/л);

2) повышенная потребность в кислороде (в 5 раз выше, чем на мелассе и в 2,5 раза выше, чем на парафинах);

3) сравнительно медленный рост микроорганизмов.

Аппаратура должна обеспечить высокую интенсивность массообмена, так как основные питательные вещества — метан и кислород — газы. Несмотря на ряд технических трудностей при работе с газообразным сырьем, в определенных условиях получение микробного белка на метане является наиболее выгодным. Так, в США в 1973 г. стоимость 1 т белка (в долларах) из мелассы составляла 90—150, из жидких парафинов 84—116, из этанола 70—136, метанола 91—145, а из метана 45—92. На получение 1 т сухой бактериальной биомассы расходуется 1,25—1,33 т метана.

Представление о процессе ферментации дает следующий пример выращивания *Methanomonas* в ферментаторе с замкнутой системой циркуляции газовой смеси по периодической схеме культивирования. Состав газовой смеси следующий: 8—11% кислорода, 10—15% метана, не более 5% углекислого газа, остальное — азот. Газ непрерывно пропускается через культуральную жидкость — раствор солей, в котором суспендирована культура клеток. По мере образования избыточный углекислый газ поглощается в колоннах с натронной известью. Температура культи-



вирования  $30^{\circ}\text{C}$ , давление в начале ферментации 4 МПа ( $40 \text{ кгс/см}^2$ ), в конце 0,1 МПа ( $1 \text{ кгс/см}^2$ ). При такой технологии за 2 сут достигается концентрация биомассы около 1 г на 1 л культуральной жидкости.

Возможно и непрерывное, проточное культивирование микроорганизмов на природном газе (метан). В этом случае достигается концентрация биомассы 12—15 г и более на 1 л культуральной жидкости, более высокое содержание белка (73%), чем в дрожжах, причем белок богаче серусодержащими аминокислотами.

### БИОМАССА ВОДОРОДНЫХ БАКТЕРИЙ

Водородные бактерии способны активировать молекулярный водород благодаря наличию гидрогеназ и, таким образом, получать энергию в виде АТФ для синтетических процессов и фиксации углекислого газа через восстановительный пентозофосфатный цикл. Сырьем для получения биомассы в данном случае являются газы  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ,  $\text{O}_2$  и смесь минеральных солей. Наиболее хорошо изученные представители этой группы *Hydrogenomonas* имеют форму палочек с жгутиками. Их легко выделить из почвы на простой минеральной среде в виде накопительной культуры, причем необходима смесь газов — кислорода, водорода и углекислого газа. Для получения бактериальной биомассы можно, например, использовать *Hydrogenomonas eutropha*. Культуру сначала размножают в стерильных условиях в колбах с магнитными мешалками на среде Шлегеля при периодическом продувании среды газовой смесью (в %):  $\text{H}_2$  — 75;  $\text{O}_2$  — 15;  $\text{CO}_2$  — 10. Затем выращивание продолжают в рабочих ферментаторах с высокой массообменной характеристикой. Посевной материал должен содержать биомассы 3—5 г на 1 л культуральной жидкости. Для ферментации используют среду следующего состава (в г/л): хлорид аммония — 1,5; одно- и двузамещенные фосфаты калия — по 2,5; двузамещенный фосфат натрия — 1; сульфат магния — 0,5; цитрат железа — 0,08; хлорид кальция — 0,02 и 3 мг/мл стандартного раствора микроэлементов Хоагланда.

Оптимальное значение реакции среды 6,8, температуры —  $31$ — $32^{\circ}\text{C}$ . Во время ферментации среда интенсивно перемешивается и продувается газовой смесью. Процесс контролируется по изменению парциального давления кислорода и углекислого газа. Ферментация хорошо идет по непрерывной схеме культивирования, при этом не существует опасности загрязнения посторонней микрофлорой, так как *Hydrogenomonas* имеет большую скорость роста, а среда выращивания непригодна для гетеротрофных микроорганизмов. Удельная скорость роста  $\mu$ , а следова-



тельно, и скорость протока  $D$  зависят от желаемой концентрации биомассы. При  $D = 0,4 \text{ ч}^{-1}$  концентрация биомассы устанавливается около 4 г/л.

В периодическом режиме выращивания достигается концентрация биомассы до 50 г на 1 л культуральной жидкости, что дает продуктивность системы, равную 4,5 кг/ч биомассы на 1 м<sup>3</sup> емкости.

Необходимо отметить, что в настоящее время существуют ферментаторы с вмонтированными электродами для электролиза воды во время ферментации. В этом случае водород и кислород образуются прямо в культуральной жидкости, но этот процесс требует больших затрат электроэнергии.

### МЕДИЦИНСКИЕ ДРОЖЖИ

Медицинские дрожжи получают из побочного продукта пивоваренной промышленности — жидких пивных дрожжей. При производстве пива на каждый декалитр его образуется 0,05—0,1 кг дрожжей, содержащих 10—12% сухих веществ. Издавна пивные дрожжи используются в медицине, главным образом для лечения различных авитаминозов. Пивные дрожжи из хмеля имеют неприятный, горький вкус, поэтому при получении медицинских дрожжей от него надо избавиться. Для этого жидкие дрожжи обрабатывают 1%-ным раствором поваренной соли, затем многократно промывают водой и сепарируют. Обработанные таким образом дрожжи сушат в сушилках распылительного или другого типа при температуре не выше 110°C. Содержание влаги в медицинских дрожжах 7—8%.

### ЗАКВАСКИ МОЛОЧНОКИСЛЫХ БАКТЕРИЙ

Молочнокислые бактерии широко используются в молочной промышленности, в пищевой промышленности, в сельском хозяйстве и в ветеринарии. Наиболее широко используемые в народном хозяйстве культуры молочнокислых бактерий приведены в табл. 14.

В СССР молочная промышленность обеспечивается жидкими или сухими заквасками из специализированных лабораторий чистых культур. В качестве примера можно привести метод приготовления сухих заквасок с использованием распылительных культур бактерий пока осуществляется по периодическому методу культивирования. Использование непрерывного метода культивирования затрудняет сложный микробиологический состав закваски — несколько культур с отличающимися физиологически-

Таблица 14. Использование

Продукты
Молоко
Сметана
Творог
Простокваша
Сыры
Ацидофильное молоко и п.
Хлебопек.
Ржаной и пшеничный хле.
Силосованные корма

и свойствами. Серьезно  
молочнокислых бакт.  
для всех стрептококк.  
Если не требуется в  
живания, то можно  
пользоваться целыми  
чае урожай  
клеток в  
Хорошо  
молочнокисл.  
ляется с  
жанием  
сухого мо  
ал долже  
ния бакте  
в течение  
40°C в тече  
ральную ср  
до исходной



Таблица 14. Использование молочнокислых бактерий в народном хозяйстве

Продукты	Культура или смесь культур закваски
Молочная промышленность	
Сметана	<i>Streptococcus lactis</i> , <i>Str. cremoris</i> , <i>Str. diacetylactis</i>
Творог	<i>Str. lactis</i> , <i>Str. diacetylactis</i> , <i>Str. acetoinicus</i>
Простокваша	<i>Str. lactis</i> , <i>Str. acetoinicus</i> , <i>Str. diacetylactis</i>
Сыры	<i>Str. lactis</i> , <i>Str. cremoris</i> , <i>Str. acetoinicus</i> , <i>Str. paracitrovorus</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobac. casei</i>
Ацидофильное молоко и паста	<i>Lactobac. acidophilus</i> , <i>Lactobac. fermenti</i>
Хлебопекарная промышленность	
Ржаной и пшеничный хлеб	<i>Lactobac. lactis</i> , <i>Lactobac. delbrückii</i> , <i>Lactobac. plantarum</i> , <i>Lactobac. brevis</i>
Сельское хозяйство	
Силосованные корма	<i>Lactobac. plantarum</i> , <i>Str. lactis diastaticus</i>

ми свойствами. Серьезную опасность при производстве закваски молочнокислых бактерий представляют фаги, которые найдены для всех стрептококков и многих видов молочнокислых палочек. Если не требуется выделить бактериальную массу после выращивания, то можно в качестве основного компонента среды использовать цельное или обезжиренное молоко. В последнем случае урожай молочнокислых бактерий составляет  $1,0 \cdot 10^9 \div 2,0 \cdot 10^9$  клеток в 1 мл среды.

Хорошей питательной средой для размножения культуры молочнокислых бактерий, предназначенной для высушивания, является стерильное обезжиренное молоко с повышенным содержанием сухих веществ (до 16%), что достигается добавлением сухого молока и 0,1% лимоннокислого натрия. Засевной материал должен составлять 1% от объема среды. Процесс размножения бактерий осуществляется без аэрации при температуре 30°C в течение 12—16 ч для молочнокислых стрептококков и при 40°C в течение 6 ч для молочнокислых палочек. Затем культуральную среду нейтрализуют 20%-ным раствором едкого натра до исходной кислотности стерильного молока. Жидкую закваску



высушивают в распылительной сушилке с температурой поступающего воздуха 130—140°C. В зоне распыления температура не должна превышать 48—50°C. Остаточная влажность сухой закваски 5—7%. Выживаемость стрептококков при сушке в описанных условиях 18—33%, а ацидофильных палочек — 7—8%.

В последнее время в производстве наметилась тенденция получения бактериального концентрата путем центрифугированного отделения клеток от среды. Если предполагается высушивание клеток, их отделение от среды лучше проводить в начале стационарной фазы роста. При использовании отечественной суперцентрифуги С-44 с паспортной производительностью 10 л/ч, частотой вращения 20 000 об/мин фактическая производительность оказалась на 50% ниже. В производственных условиях для отделения биомассы можно использовать суперцентрифугу ГС-100 производительностью 800 л/ч и частотой вращения 15 000 об/мин.

Полученный бактериальный концентрат имеет пастообразную консистенцию; содержит на 1 г концентрата стрептококков 127—500 млрд. жизнеспособных клеток и 52—100 млрд. молочнокислых палочек. Остаточная влажность 70—72%. Оптимум рН для стрептококков 5,0—5,2, для ацидофильных палочек 4,5—4,7. Такой концентрат необходимо хранить при 4—6°C, сохранность клеток улучшает добавление 0,003% бромистого калия. Длительное хранение пастообразного концентрата невозможно, его необходимо сушить или хранить в замороженном виде.

Аналогичным методом получают закваски для силосования кормов. Для улучшения качества жома на сахарных заводах рекомендуют использовать культуру *Lactobac. plantarum* АН<sup>11/16</sup>, которую выращивают на стерильной жомовой воде, обогащенной мелассой (до 2% сахара). Активная культуральная жидкость *Lactobac. plantarum* разбрызгивается на поверхности жома, поступающего на хранение в ямы. Отмечается высокое качество жома, заквашенного при помощи этой культуры.

### ВАКЦИНЫ

Вакцины являются одним из наиболее важных профилактических средств в охране человека и животных от инфекционных болезней, вызываемых бактериями и вирусами. Вакцины — препараты биологического происхождения, обладающие антигенными свойствами, т. е. способностью создать иммунитет в организме человека и животных.

Вакцины производят в виде живых, ослабленных или инактивированных бактериальных или вирусных препаратов, а также в виде инактивированных токсинов белковой природы, продуци-



руемых клетками микроорганизмов. Из бактерий, которые не выделяют экзотоксин, обычно получают вакцины в виде препарата инаktivированных клеток или в виде антигена — вещества, выделенного из клеток. К живым бактериальным вакцинам принадлежит противотуберкулезная вакцина, авирулентные палочки чумы и т. д. К живым вирусным вакцинам относятся препараты вакцин полиомиелита, оспы, желтой лихорадки и др. В медицине используют также комплексы вакцин, куда входят многие антигены, которые в организме образуют иммунитет к различным инфекционным заболеваниям.

В качестве продуцента при производстве вакцин используют особые, адаптированные на специальных питательных средах культуры вирусов и бактерий. Работая с живыми вакцинами, надо следить за тем, чтобы под воздействием мутагенных факторов культура не восстановила свою вирулентность или не потеряла свои антигенные свойства. Важно подобрать такую питательную среду, чтобы облегчить дальнейшую очистку препарата. В производстве вакцин широко используют среду, приготовленную из гидролизата казеина с добавками глюкозы, дрожжевого автолизата или кукурузного экстракта. При получении дифтерийного токсина или вакцин кишечных заболеваний, культивируя глубинным методом аэробные бактерии, используют обычные системы аэрации. При культивировании анаэробных бактерий, например возбудителя столбняка, для удаления кислорода из среды через нее пропускают инертный газ, например азот.

Если для приготовления вакцины используют биомассу бактерий, после ферментации клетки отделяют центрифугированием или фильтрацией и промывают для удаления остатков питательной среды. Если антиген находится в растворе (токсин), его стерилизуют методом холодной стерилизации (фильтрация).

Для получения противотуберкулезной вакцины клеточную массу лиофилизируют, используя специальные защитные среды. Ослабленную культуру *Mycobacterium tuberculosis bovis* лиофилизируют в среде, содержащей 7,5% сахарозы, 8% декстрина, 2% глутамата натрия и 0,01% гидроксиламина.

Получая инаktivированные вакцины (брюшного тифа, холеры), биомассу медленно нагревают до 58—61°C или обрабатывают формалином или спиртом. Инаktivированные вакцины в организме вызывают образование иммунитета при помощи определенной фракции клеточной массы — липопроteidного комплекса, поэтому в последнее время эти вакцины пытаются освободить от балластных веществ, выделяя химическим путем содержащий антигены комплекс. Для этого клеточную массу обрабатывают трихлоруксусной кислотой или трипсином и затем антиген осаждают этиловым спиртом или ацетоном.



Доказано, что высокий иммунный эффект имеют некоторые полисахаридные фракции. Так, очень маленькие (5 мкг) инъекции полисахаридной фракции пневмококков могут защитить организм от заболевания пневмонией.

Выделение, очистку и концентрирование антигенных токсинов проводят обычными химическими методами. В этих процессах нельзя допустить денатурацию специфического белка (антигена). Чаще всего токсины высаливают растворами нейтральных солей или осаждают спиртом или ацетоном.

Аналогично производят вакцины вирусов. Вирусы размножаются только в живых клетках или в организме или вне его в культурах тканей. В вакцинировании домашних животных еще теперь используют вакцины, полученные из органов, например, лимфатических желез, селезенки и др. больных животных. Такие органы размельчают и лиофилизируют в ампулах. От одной козы можно получить вакцину для 2000 доз.

Вакцину оспы человека получают от телят. Одно животное дает около 500 мл жидкого материала, который содержит 350 000 доз.

Для размножения вирусов используют куриные эмбрионы или особые пересеваемые культуры тканей.

По методу, разработанному Солком, вирус полиомиелита размножают в тканевой культуре почек обезьяны. Для этого ткань коркового слоя свежих почек размельчают и суспендируют в специальной среде (№ 199). Затем размельченную ткань многократно обрабатывают по 20 мин 0,5%-ным раствором трипсина при pH среды 7,6, чтобы ферментативно гидролизовать ткани и отделить клетки одну от другой. Затем суспензию клеток центрифугируют и клетки суспендируют в той же среде с добавками плазмы телячьей крови или гидролизата лактальбумина. Суспензию клеток инкубируют 5 сут в особых сосудах, где за это время на стенках сосуда образуется однослойная пленка клеток.

Когда клетки вырастут, жидкую фракцию сливают, клетки промывают изотоническим раствором поваренной соли, добавляют свежую среду и засевают ее соответствующим вирулентным вирусом полиомиелита. После 3-дневного инкубирования вируса в этой культуре клетки последние полностью разрушаются и вирусы переходят в раствор. Остатки клеток удаляют центрифугированием и оставшийся раствор используют для вакцинации. Для сохранения вакцины ее замораживают.

Теперь вакцину Солка не используют, а для вакцинации против полиомиелита используют живую вакцину полиомиелита Себина, которую готовят из ослабленных вирусов полиомы и размножают на диплоидных клеточных культурах человека.

БАКТЕРИАЛ...  
Особое место в жизни расте...  
бактерии, живущие либо в поч...  
корневых клубеньках бобовых...  
бактерии. Эти бактерии имеют...  
для фиксации молекуляр...  
растения соединения.  
Предпосевная обработка се...  
елью отобранными активными...  
бобовых бактерий позволяе...  
ние растений азотом, повысит...  
резервным азотом. Виды Азо...  
20—40 кг азота на каждый гек...  
терии в симбиозе с бобовыми...  
бактерии также синтезируют...  
и другие физиологически важ...  
В практике сельского хозяй...  
бактерин и нитрагин. Азотоба...  
вых клеток *Azotobacter*, а ни...  
бактерий. Из бактериальных...  
фосфобактерин — клеточный...  
*phosphaticum*. Эти спорообра...  
лизуют органические соеди...  
нуклеиновые кислоты, леци...  
обеспечивают растения дост...  
ных соединений. К этой гру...  
Эпифитными называют...  
растений — листьях, стволе...  
пользующие различные вы...  
роbiology им. А. Кирхен...  
ные культуры эпифитных...  
ние корневой системы рас...  
образом увеличивающих ра...  
лено, что эти эпифитные...  
пы В, гетероауксин и дру...  
Чтобы физиологическ...  
ний, вносимых в почву, п...  
зультате их действия ул...  
ния наносят на семена...  
В современной агротехн...  
уничтожается не только...  
мян. Поэтому возобнов...  
сти семян является ва...



## БАКТЕРИАЛЬНЫЕ УДОБРЕНИЯ

Особое место в жизни растений занимают азотфиксирующие бактерии, живущие либо в почве, например *Azotobacter*, либо в корневых клубеньках бобовых растений, например клубеньковые бактерии. Эти бактерии имеют ферментные системы, катализирующие фиксацию молекулярного азота воздуха в доступные для растения соединения.

Предпосевная обработка семян культурных растений специально отобранными активными культурами *Azotobacter* или клубеньковых бактерий позволяет значительно улучшить обеспечение растений азотом, повысить урожайность и обеспечить почву резервным азотом. Виды *Azotobacter* в течение года связывают 20—40 кг азота на каждый гектар площади, а клубеньковые бактерии в симбиозе с бобовыми культурами — 100—300 кг/га. Эти бактерии также синтезируют активные витамины, фитогормоны и другие физиологически важные вещества.

В практике сельского хозяйства широко используются азотобактерин и нитрагин. Азотобактерин является препаратом живых клеток *Azotobacter*, а нитрагин — препаратом клубеньковых бактерий. Из бактериальных удобрений надо отметить также фосфобактерин — клеточный препарат *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*. Эти спорообразующие бактерии активно минерализуют органические соединения фосфора (нуклеопротеиды, нуклеиновые кислоты, лецитин, фитин и др.) и, следовательно, обеспечивают растения доступными для него формами фосфорных соединений. К этой группе относятся и препараты эпифитных бактерий растений.

Эпифитными называют бактерии, живущие на поверхности растений — листьях, стволе, корнях — и для своего развития использующие различные выделения растений. В Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР выделены активные культуры эпифитных бактерий, стимулирующих образование корневой системы растений, ускоряющих их рост и таким образом увеличивающих урожай культурных растений. Установлено, что эти эпифитные бактерии синтезируют витамины группы В, гетероауксин и другие полезные растениям вещества.

Чтобы физиологическое воздействие бактериальных удобрений, вносимых в почву, происходило вблизи семян и чтобы в результате их действия улучшалось питание растений, эти удобрения наносят на семена растений непосредственно перед посевом. В современной агротехнике протравливают семена, в результате уничтожается не только вредная, но вообще вся микрофлора семян. Поэтому возобновление полезной микрофлоры на поверхности семян является важным мероприятием. Ясно, что эта иску-



ственная микрофлора в почве входит в контакт как с физико-химическим комплексом почвы, так и с микрофлорой почвы.

Это значит, что, производя отбор культур для бактериальных удобрений, надо исходить не только из их способности усваивать азот и синтезировать активные вещества, но и конкурировать с почвенной микрофлорой, исходить из их агрессивности и вирулентности.

Для производства азотобактерина используют культуру *Azotobacter chroococcum*. Это аэробные бесспорные организмы. Клетки *Azotobacter* в период деления продолговатые или овальные. Их размеры 2—5 мкм. При старении вокруг клеток образуются слизистые капсулы. Виды *Azotobacter* могут расти в среде без источника азота. Активность фиксации азота воздуха увеличивает присутствие соединений молибдена, поэтому его соли всегда добавляют к среде. В качестве примера можно указать состав питательной среды, на которой сравнительно хорошо растут культуры *Azotobacter* (г/л воды):

Маннит (углеводы, кислоты, спирты)	1,5
$K_2HPO_4$	0,2
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2
$CaCl_2$	0,02
$FeCl_3$ (10%-ный раствор в воде)	0,05
Соли молибдена	Следы

Оптимальная температура среды 25—27°C, pH 7,2.

Для приготовления почвенного или торфяного азотобактерина используют хорошо культивированную, богатую перегноем почву или разлагающийся торф с нейтральной реакцией. Грубые частицы и примеси отделяют просеиванием. К просеянной почве или торфу добавляют 1—2% извести или мела и 0,1% суперфосфата. Затем по 500 г этой смеси помещают в пол-литровые бутылки, увлажняют водой до 40—60% (по объему), закрывают ватными пробками и стерилизуют. Посевной материал выращивают на агаровых средах, содержащих 1—2% сахарозы и минеральные соли. Культуру инкубируют 3—5 сут при температуре 26—27°C до тех пор, пока поверхность агара не покроется слизистой массой.

Стерильной водой массу клеток смывают и эту водную суспензию в стерильных условиях вводят в стерильную почву или торф. Затем содержимое бутылок тщательно перемешивают и помещают в термокамеру для размножения клеток. В каждом грамме торфа или почвы должно быть не менее 50 млн. клеток. Длительность хранения препарата 2—3 мес. Помещение, в котором хранят культуру, должно быть прохладным и хорошо про-



ветриваемым. На обработку семян для засева 1 га пашни необходимо 3—6 кг почвенного азотобактерина. Надо сказать, что изготовление почвенного азотобактерина — процесс трудно механизуемый и требует много ручного труда. Кроме того, почва содержит очень разнообразную микрофлору, что создает угрозу инфицирования помещения.

В практике встречаются и другие виды азотобактерина, например, агаровый азотобактерин и даже сухой азотобактерин. Наиболее удобен в обращении сухой азотобактерин, однако метод его получения полностью еще не разработан.

Использование азотобактерина дает возможность увеличить урожай зерновых на 2—4 ц/га, т. е. на 10—18%. Еще больший эффект этот препарат оказывает на томаты, кормовую свеклу, картофель.

Нитрагин — наиболее распространенное бактериальное удобрение, используемое для инфицирования семян бобовых растений. Клубеньковые бактерии принадлежат к роду *Rhizobium*. Это аэробные небольшие палочковидные, иногда подвижные, грамтрицательные, бесспорные бактерии. В клубеньках корневой системы растений бактерии образуют разнообразные по форме бактериоиды. Клубеньковые бактерии хорошо растут на средах, содержащих экстракт (отвар) из бобов или других растений, при температуре 20—26°C и pH 7,0. Для каждой культуры бобовых растений нитрагин готовят из соответствующих штаммов группы клубеньковых бактерий, которые микробиологи получают путем тщательного отбора, исходя как из способности фиксации азота, так из интенсивности проникновения бактерий в клубеньки корневой системы растений.

Для получения агарового нитрагина готовят отвар гороха или бобов с добавлением 1,0% сахарозы и 1,5% агара. Стерильную среду заливают в пол-литровые бутылки, где она затвердевает. Посевной материал также размножают в гороховом или бобовом отваре и затем суспензией клеток заливают поверхность агара в бутылках. Бутылки помещают в термокамеру при 20°C на несколько суток, пока масса бактерий не покроет всю поверхность питательной среды. Готовый агаровый нитрагин хранят в прохладном (0—10°C), хорошо проветриваемом помещении. Для обработки семян препарат можно использовать в течение 4 мес.

Известны и другие виды нитрагина. Почвенный нитрагин производят подобно азотобактерину.

Для получения сухого нитрагина соответствующую культуру размножают в качалочных колбах на меласной среде с добавками солей, а затем — в ферментаторе в аэробных условиях. Когда достигнут максимальный клеточный титр и культура об-



ладает наибольшей резистентностью, биомассу отделяют центрифугированием и обезвоживают контактным методом, используя в качестве наполнителя и адсорбента воды сухой стерильный каолин. Биомассу обезвоживают также лиофилизацией из особой защитной среды. В этом случае биомассу предварительно замораживают при  $-20 \div -40^{\circ}\text{C}$  и затем сублимируют в вакууме при остаточном давлении 12—130 кПа. Во время сублимации температура биомассы не должна превышать  $30^{\circ}\text{C}$ . Остаточная влажность сухого нитрагина 3—7%. В процессе сушки часть клеток инактивируется. В качестве защитной среды используют сахарозу — желатин, сыворотку крови, мелассу. При лиофилизации в защитных средах число инаktivированных клеток не превышает 20—50%.

В процессе бактеризации семян на каждое семя надо нанести около 20000 клубеньковых бактерий. Количество нитрагина вместе с наполнителем, необходимое на обработку 1 га площади, не превышает 500 г.

Для получения фосфобактерина используют культуру *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum*. Это мелкие, аэробные, спорообразующие палочки размером  $(1,8 \div 2) \times (2,5 \div 6)$  мкм. Бактерии размножают методом глубинного культивирования в меласной среде с добавками кукурузного экстракта и питательных солей. Ферментацию ведут в аэробных условиях до стадии образования спор. Многие штаммы *Bacillus megaterium* var. *phosphaticum* чувствительны к действию фагов, поэтому в процессе ферментации может иметь место фаголиз. В производстве фосфобактерина всегда должно быть несколько штаммов, выносливых по отношению к фагам.

Из культуральной жидкости биомассу выделяют центрифугированием. Затем ее сушат лиофилизируя или в сушилках распылительного типа. Остаточная влажность препарата 2—3%. В отличие от азотобактерина и нитрагина этот препарат сравнительно стабилен при высушивании, поэтому успешно используют даже конвективный метод сушки, применяя распылительные сушилки с температурой воздуха  $70-80^{\circ}\text{C}$ . Храня сухой фосфобактерин при комнатной температуре, не наблюдают большой инаktivации клеток. В течение года активность теряют не более 20% клеток. В каждом грамме фосфобактерина должно быть не менее 200 млн. жизнеспособных клеток.

Для бактеризации зерновых используют 250 г этого препарата на 1 га; для картофеля и овощей доза увеличивается. В условиях Латвийской ССР применение фосфобактерина увеличило содержание доступного растениям фосфора в почве на 10—11%.

Для получения эпифитных стимуляторов растений используют отобранные по биологическим тестам культуры родов *Pseu-*



domonas или Pseudobacterium. Это бесспорные бактерии, хорошо растущие на питательных средах, содержащих углеводы и растительные экстракты. К примеру можно привести среду следующего состава (в г/л):

Пшеничные отруби (отвар)	20
Сахароза	10
Пептон	2,5

Оптимальная температура 26—28°C; рН 7,0.

Посевной материал выращивают в колбах на качалке, затем в аэробных условиях по методу глубинного культивирования в ферментаторе за 2—3 сут увеличивают сухую биомассу бактерий до 4—8 г/л. Бактерии этих групп, как и большинство микроорганизмов, лучше всего переносят высушивание в стационарной фазе роста. После центрифугирования получают пасту с 89—92%-ным содержанием влаги. Для высушивания можно использовать контактный метод, применяя в качестве адсорбента сухой стерильный каолин, равномерно примешиваемый к биомассе в таком количестве, чтобы влажность смеси была 7%. В таком виде получают сухой препарат, в котором сохраняется 40—60% живых клеток. Хорошие результаты дает лиофилизация с применением защитных сред, например сахарозы — желатина и др.

Масса препарата, необходимая для обработки 1 га площади, не превышает 0,5 кг. Бактеризация этим препаратом семян зерновых дает увеличение урожая на 10—15%, а для корнеплодов, особенно сахарной свеклы, — даже на 20%.

#### БАКТЕРИАЛЬНЫЕ СРЕДСТВА ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ

Вредители лесов, полей и садов ежегодно приносят огромный ущерб народному хозяйству. Для их уничтожения широко используют ядохимикаты, но до сих пор еще не найдены такие химические соединения, которые воздействовали бы только на один вид вредных насекомых, т. е. ядохимикаты очень узкого и специфического воздействия. Обычно при использовании ядохимикатов страдает и полезная фауна, кроме того, не исключено их отрицательное воздействие на организм человека. Сейчас в борьбе с вредителями все чаще используют биологические методы. При использовании методов микробиологического воздействия на вредителей растений с помощью специфических микроорганизмов или вирусов вызывают инфекционные заболевания определенного вида вредителей. Они передают инфекцию друг другу и в результате погибают.



Активные культуры энтомопатогенных микроорганизмов находят при изучении микрофлоры погибших насекомых. Чаще всего вызывают гибель вредителей изолированные культуры при помощи выделяемых ими токсинов. Для уничтожения вредителей садово-овощных и плодовых культур широко используют энтобактерин, препарат спорообразующих бактерий *Bacillus cereus*. Энтобактерин получают методом поверхностного или глубинного культивирования. При работе с поверхностной культурой в качестве среды используют перемолотую, влажную и дважды стерилизованную рожь, которую затем инфицируют спорами.

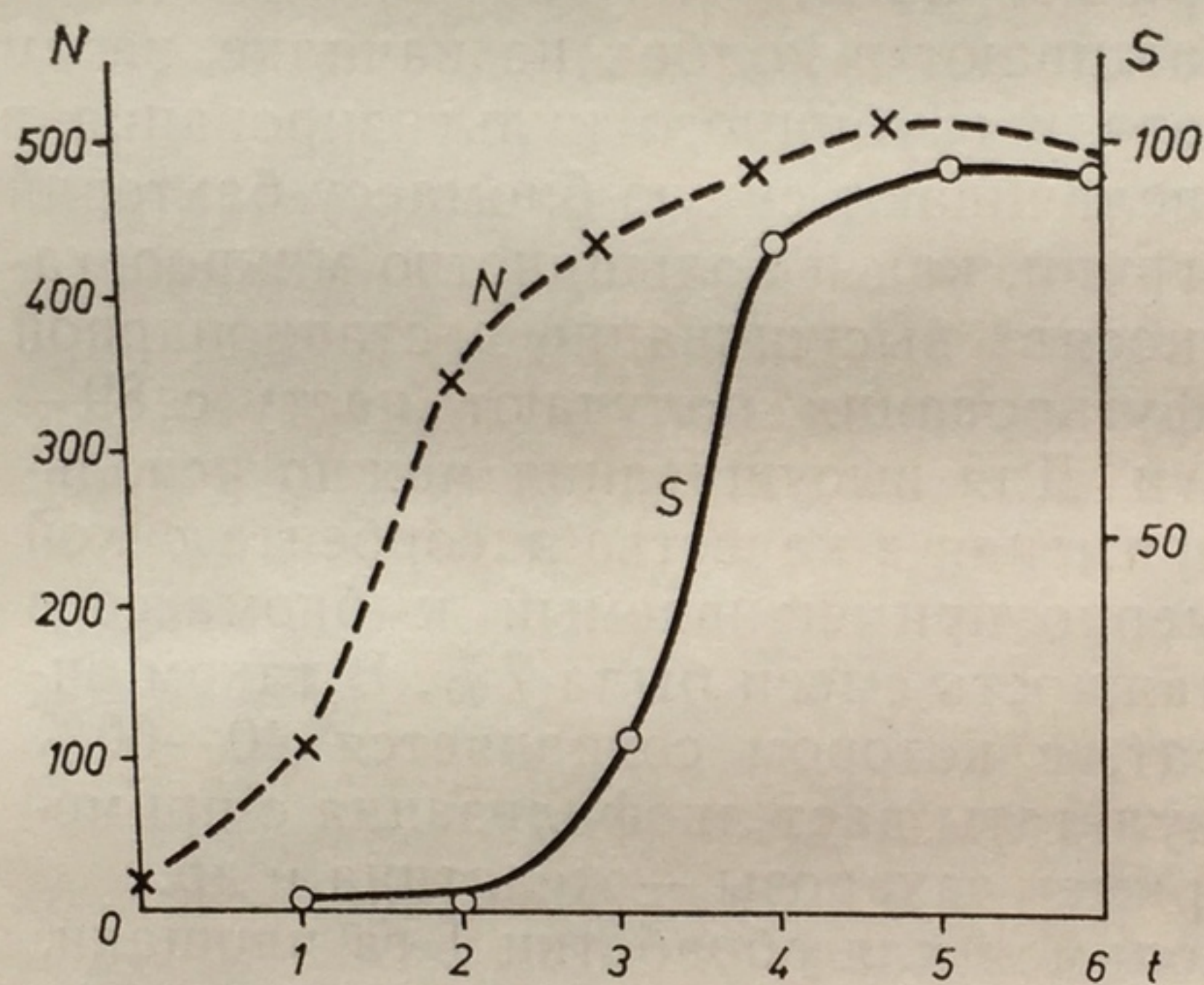


Рис. 43. Динамика размножения и спорообразования культуры *Bacillus cereus*:

$N$  — число клеток (млн./г),  $S$  — образование спор (в %),  $t$  — время (сут)

Бактерии *Bacillus cereus* культивируют при температуре 26 — 28°C. Динамика размножения и образования спор данной культуры показана на рис. 43. За 5 сут в каждом грамме среды образуется до 500 млн. клеток, при этом 98% клеток образуют споры. Параллельно образованию спор из клеток выделяется в виде кристаллов синтезированный токсин.

Клеточную массу вместе со средой высушивают при 40°C и размельчают, получая тонкий порошок.

Такой метод получения энтобактерина прост и легко может быть использован в производственных лабораториях.

В промышленных условиях энтобактерин получают глубинным культивированием. Полученную клеточную массу с содержащимися в ней спорами высушивают лиофилизацией или в распылительной сушилке. Культура *Bacillus cereus* восприимчива к фагам, поэтому селекционеры усиленно ищут фагоустойчивые активные культуры.

Энтобактерин хорошо показал себя в практике сельского хозяйства. Доказано, что он уничтожает около 30 различных видов садовых вредителей. При опылении 2 кг этого препарата 1 га площади, занятой капустой или другими овощами, в течение 5 дней погибает до 97% вредителей.

Аналогичные энтомопатогенные препараты можно получить,



используя культуры других видов микроорганизмов, например, *Chromobacterium prodigiosum*, *Pseudomonas pyocyanea*, *Bac. thuringiensis*.

В биологической борьбе с вредителями растений используют также микроскопические грибы, например *Beauveria bassiana*. В Институте биологии АН ЛатвССР выделен местный Рижский штамм, из которого готовят препарат боверин. При распылении суспензии этого препарата на картофельные поля (1—5 кг/га) уничтожаются гусеницы листоеда.

Препараты микробиологического происхождения используются для борьбы с грызунами — мышами и крысами. Для приготовления этих препаратов используют бактерии, возбудители тифа у грызунов.

## Глава VI

### ПОЛУЧЕНИЕ ЛИПИДОВ, ПОЛИСАХАРИДОВ, ЭТИЛОВОГО СПИРТА И ОРГАНИЧЕСКИХ РАСТВОРИТЕЛЕЙ

#### ЛИПИДЫ

Под липидами в данном случае подразумеваются растворимые в неполярных растворителях клеточные компоненты микроорганизмов. Их концентрация составляет до 75% сухой биомассы. В состав липидов микроорганизмов входит сравнительно много ненасыщенных жирных кислот. Так, в липидах плесневого гриба *Penicillium sorpii* из жирных кислот содержатся пальмитиновая — 22%, стеариновая — 7,6%, олеиновая — 45,2% и линолевая — 20% от общего их количества. Соотношение насыщенных и ненасыщенных кислот зависит не только от свойств продуцента, но и от условий культивирования. Низкая температура стимулирует синтез ненасыщенных жирных кислот у грибов. Общее количество и соотношение жирных кислот зависит и от присутствия K, Mg, Na и их соотношения в среде.

Синтез липидов стимулируют ингибиторы углеводного обмена, например арсенит натрия.

Так как для производства липидов микробного происхождения может быть использовано дешевое сырье, они в перспективе могут заменить жиры и масла растительного и животного происхождения, используемые для технических нужд. Таким дешевым исходным сырьем являются гидролизаты древесины или торфа, а также продукты нефти. Чтобы в клетках микроорганизмов на-



копилось максимальное количество липидов, во время ферментации надо лимитировать количество азота и вести ее в аэробных условиях. За сутки в биомассе дрожжей *Rhodotorula gracilis* может образоваться 50—60% липидов. Содержание белков в биомассе при таких условиях уменьшается до 10—20%. На синтез 1 г липидов расходуется 6 г сахара.

В качестве примера можно привести культивирование дрожжей *Lipomyces lipofegus* на гидролизатах торфа, нейтрализованных известковым молоком до pH 6,0 и содержащих 1,5% РВ.

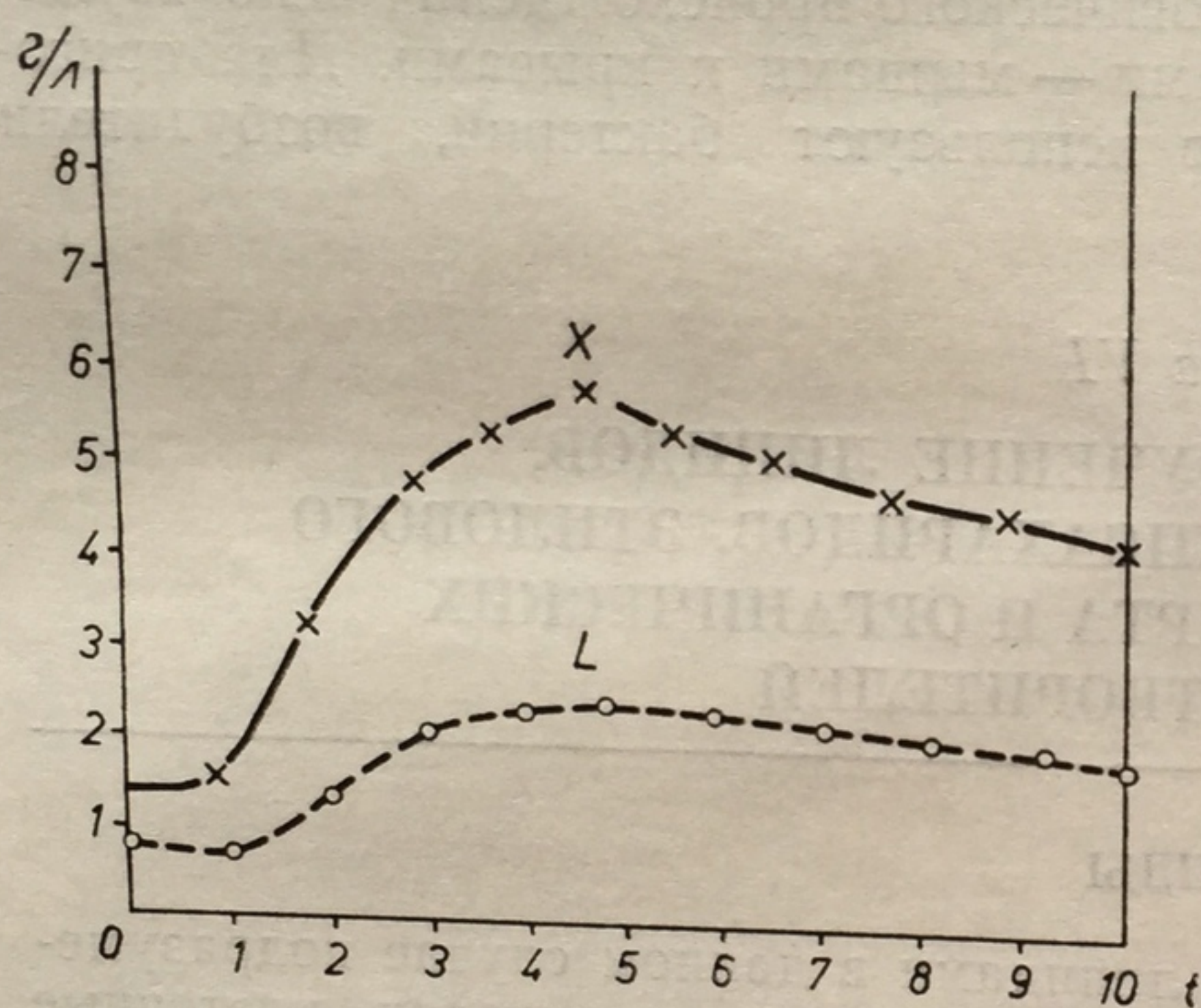


Рис. 44. Динамика образования биомассы и липидов:

X — биомасса, L — липиды, t — продолжительность ферментации (сут)

К среде добавляют дополнительно  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,1 г/л,  $\text{MgSO}_4$  — 0,04 г/л и  $\text{CaCl}_2$  — 0,04 г/л. Содержание азота в гидролизате вполне достаточно для роста культуры. Динамика образования биомассы и липидов этой культурой в лабораторных условиях показана на рис. 44.

Содержание липидов в биомассе после 4—5 сут выращивания составляет 50% по сухому веществу. В их состав входят 5,0—6,0% фосфолипидов, 4,8—6,5% стерина, 2,1—10,7% моно- и

диглицеридов, 2,3—9,6% свободных жирных кислот, 70,7—75,1% триглицеридов и 1,7—2,1% эфиров стерина и воска.

Липиды выделяют из биомассы экстракцией эфиром. Из 1 т сухого торфа можно получить 40—50 кг липидов. По физико-химическим свойствам они близки к растительным маслам, которые используют во многих отраслях промышленности для технических нужд. Возможно отобрать такие культуры микроорганизмов и создать условия культивирования, чтобы в биомассе накапливалось меньше липидов (15—30%), но больше белков (30—40%). В этом случае после экстракции липидов получают ценный кормовой препарат — микробный жмых.

В последнее время доказано, что микроорганизмы могут выделять липиды из клеток в культуральную жидкость. Культура дрожжей *Rhodotorula glutinis* выделяет из клеток уксусную



(40%), миристиновую (1%), пальмитиновую (14%), стеариновую (1,5%), олеиновую (29%), линолевую (3%), линоленовую (0,5%) и 3-дигидроксигексадекановую (8,5%) кислоты (данные приведены в процентах к общей массе экстрацеллюлярных липидов). При культивировании *Candida bogoriensis* в среде образуются игольчатые кристаллы липидов с температурой плавления 74—76°C. Эти кристаллы состоят из углевода софорозы и гидроксигокозановой кислоты, соединенных гликозидной связью.

### ПОЛИСАХАРИДЫ

Полисахариды микробного происхождения при введении в организм человека парентерально (в кровь) повышают защитные силы организма — резистентность. В клеточной стенке дрожжей около 70% по сухой массе полисахаридов — маннана и гликана.

### Зимозан

В Латвийском научно-исследовательском институте экспериментальной и клинической медицины разработан метод получения полисахаридного препарата зимозана из биомассы *Saccharomyces cerevisiae*. Для получения зимозана можно использовать дрожжи родов *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus* и другие дрожжеподобные культуры. Биомассу дрожжей получают в модифицированной среде Ридера по 11-часовой схеме культивирования в стерильных условиях, полностью исключая присутствие побочной микрофлоры и стимулируя образование клеточной стенки (на 15—20%) добавлением кобальта, марганца и меди.

После ферментации культуральную жидкость сепарируют, прессуют и дрожжевую пасту (25% сухих веществ) варят в четырехкратном объеме 0,5 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , после охлаждения до 37°C гидролизуют в среде с ферментным препаратом панкреатина (рН 7,8).

Через 16—20 сут ферментации суспензию центрифугируют. В результате варки белки денатурируются, клеточные стенки рвутся; при последующем ферментативном гидролизе белки, а также белково-полисахаридные комплексы клеточной оболочки разрушаются до аминокислот и полисахаридов. Осадок после центрифугирования промывают несколько раз холодной и горячей водой для удаления растворимых сахаров, промывают этиловым спиртом и высушивают в вакууме. Размельченный препарат используют в медицине.

Зимозан — вещество светло-серого цвета без специфического вкуса и запаха. В воде и обычных растворителях не растворяет-



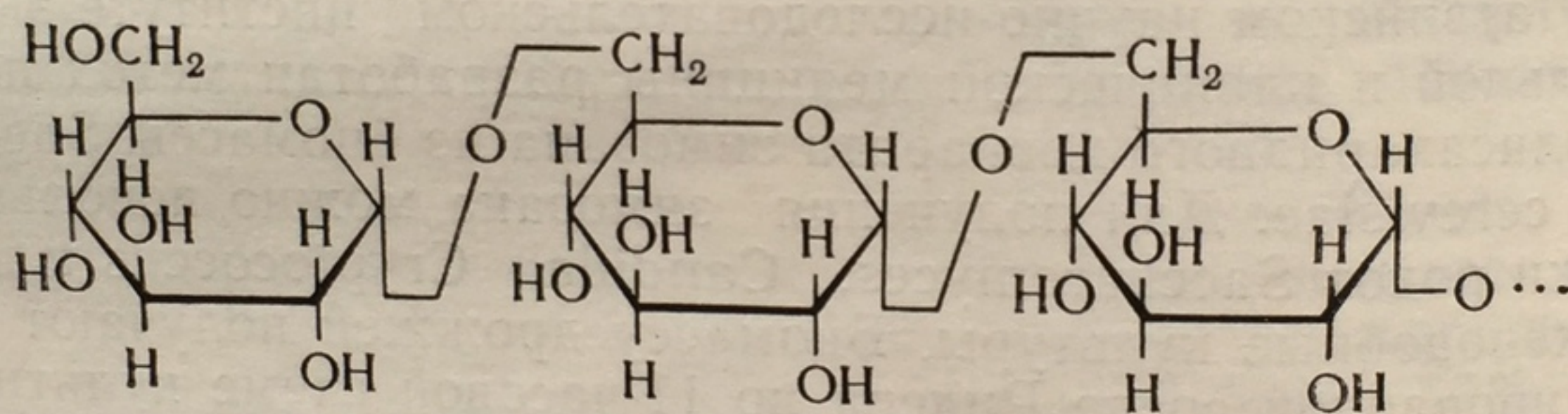
ся, а образует суспензию. В зависимости от технологии производства в него входят 30—90% углеводов, 1,0—2,3% азота, 0,1—0,8% фосфора. Из углеводов 50—60% составляет глюкоза и 7—14% манноза.

В определении качества зимозана значение имеют его биологические и серологические свойства.

Экономически выгодно перерабатывать биомассу дрожжей комплексно, получая без зимозана нуклеиновые кислоты, азотистые основания, дрожжевые ферменты — инвертазу, альдолазу и другие.

### Декстран

Это полигликозид, молекулярная масса его достигает 600 млн. Молекула декстрана состоит из 200 000 и более остатков глюкозы. Молекулы глюкозы в декстрани связаны главным образом через 1,6-гликозидную связь. В отличие от полигликозидов типа крахмала или гликогена декстран не дает реакцию с йодом.



Участок молекулы декстрана

Деполимеризованный декстран, молекулярная масса которого близка к молекулярной массе альбумина сыворотки крови, используют в медицине как заменитель сыворотки крови. Для этого готовят 6%-ный раствор декстрана в физиологической жидкости, который по коллоидным и осмотическим свойствам близок к плазме крови. Этот раствор называют полигликином.

Препарат полигликина широко используют в хирургии. Все станции скорой помощи обеспечены этим препаратом. При больших потерях крови вместо нее в кровеносную систему вводят полигликин. В опытах с собаками доказано, что даже при потере крови на  $\frac{2}{3}$  с помощью полигликина можно спасти жизнь. При восстановлении крови декстран постепенно используется на энергетические потребности. Надо отметить, что белки в такой ситуации не используются, так как организм очень резко реагирует на присутствие чужеродных белков.

Полигликин можно хранить в течение длительного времени. Ввести его в организм гораздо легче, чем переливать кровь. Од-



нако этот препарат не может полностью заменить переливание крови, так как искусственно созданная система не в состоянии выполнить функцию переноса кислорода в организме.

Для получения декстрана используют культуры *Leuconostoc mesenteroides* и *L. dextranicum*. Это шарообразные бактерии диаметром 1,0—1,5 мкм. В культуре они образуют переплетенные цепочки. На твердой, содержащей сахарозу среде они образуют колонии, покрытые толстым слоем слизи.

Главное исходное вещество при производстве декстрана — сахароза. Ферментацию ведут методом глубинного культивирования. Концентрация сахарозы в среде должна быть высокой (около 20%), а содержание азота — низким.

Для процесса полимеризации глюкозы присутствие кислорода воздуха не обязательно, но перемешивание среды воздушным потоком ускоряет реакцию. Надо отметить, что в процессе биосинтеза декстрана большое значение имеет количество магния в среде. В зависимости от этого меняется строение молекулы декстрана, степень ее разветвленности, что в свою очередь воздействует на биологическую функцию препарата в организме человека. Процесс биосинтеза идет без участия фосфора.

Биосинтез декстрана идет следующим образом: от молекулы сахарозы отщепляется молекула фруктозы, которая в своем метаболизме дает побочные продукты, такие, как молочную и уксусную кислоты или многоатомный спирт маннит. Оставшиеся молекулы глюкозы под действием фермента декстрансахаразы полимеризуются. Оптимум pH действия этого фермента от 5,2 до 5,6. Ферментация идет 20—24 ч (рис. 45).

Клинический декстран получают, обрабатывая нативный раствор декстрана метиловым спиртом. Происходит деполимеризация, и осаждается продукт с молекулярной массой 65 000—80 000. Деполимеризацию можно провести ферментативно, термически или с помощью ультразвука.

Для получения более качественного клинического препарата процесс биосинтеза (полимеризации) можно вести по методу вве-

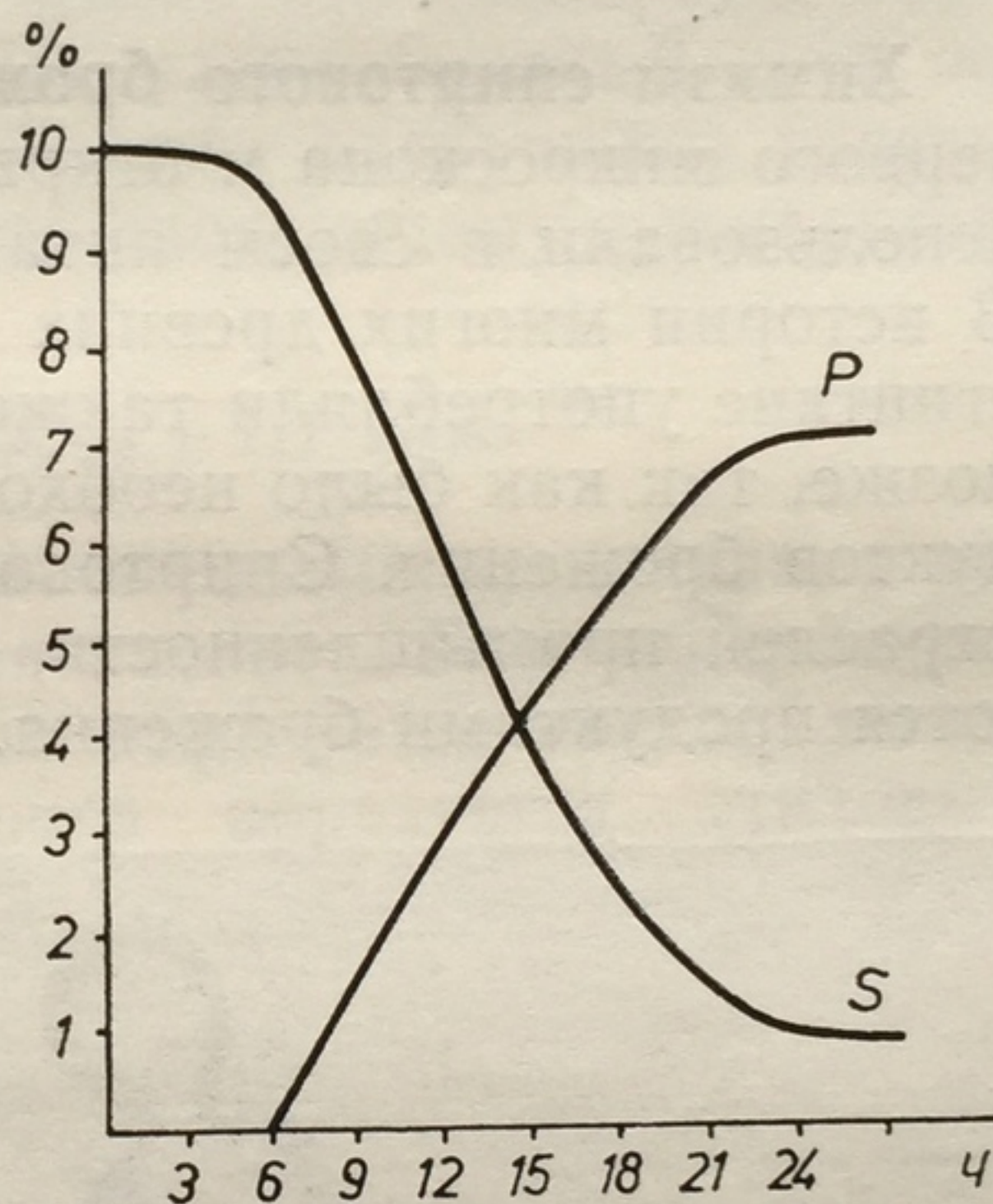


Рис. 45. Динамика биосинтеза декстрана:

P — декстран, S — сахароза



дения ростков декстрана, которые не дают образоваться слишком крупным агрегатам молекул. Для этого в среду вводят акцепторы — зачатки (ростки) с молекулярной массой 20 000—30 000 (около 5% от количества сахарозы). В этом случае ферментация идет в среде, где содержится сахарозы 20%, зачатков декстрана — 2,9%, дрожжевого экстракта — 0,3%, двузамещенного фосфата натрия — 0,5%, хлорида калия — 0,1%, pH среды 6,5—8,0.

### ЭТИЛОВЫЙ СПИРТ

**Химизм спиртового брожения.** Уже задолго до изобретения первого микроскопа и открытия микроорганизмов люди знали и использовали в своем питании продукты спиртового брожения. В истории многих древних народов описывается вино, древние египтяне употребляли также и пиво. Спирт был получен гораздо позже, так как было необходимо научиться отделять его от продуктов брожения. Спиртовое брожение лежит в основе многих отраслей промышленности, ибо все алкогольные напитки являются продуктами брожения.

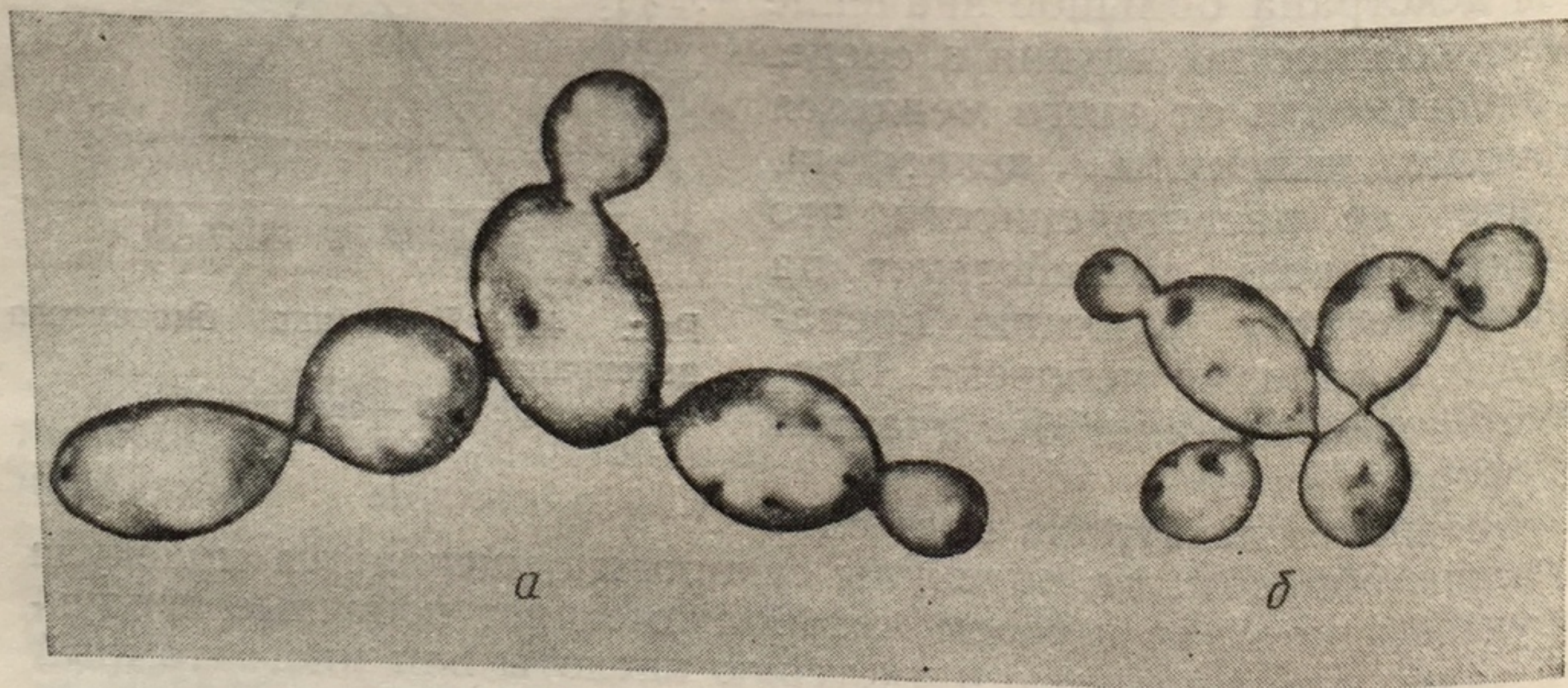


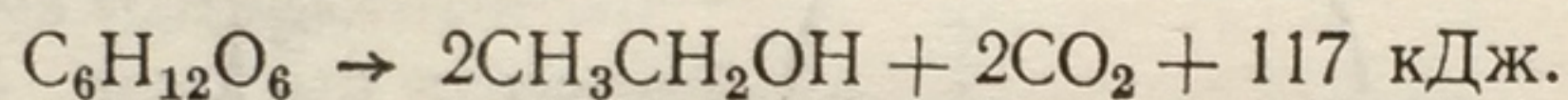
Рис. 46. Клетки дрожжей:  
а — *Sacch. cerevisiae*, б — *Sacch. elipsoideus*

Большую часть этилового спирта (53%) в нашей стране используют для технических нужд — в производстве синтетического каучука, для синтеза различных веществ, как растворитель, а 47% — на изготовление напитков и медицинские нужды.

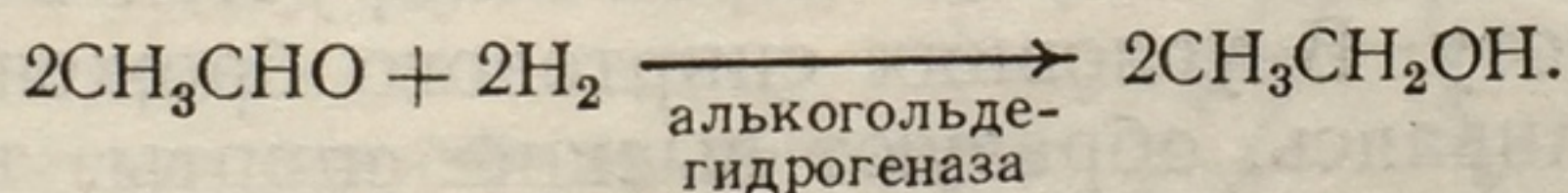
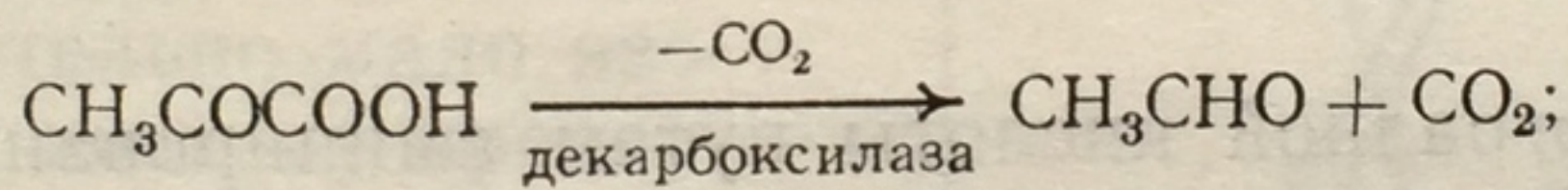
Спиртовое брожение — один из самых изученных биохимических процессов. Спиртовое брожение вызывают чаще всего дрожжи, реже некоторые бактерии (*Sarcina*) и плесневые грибы



(Мисог). В промышленности дрожжи обычно разделяют на *верховые* и *низовые*. Верховые дрожжи интенсивно ведут брожение и труднее осаждаются. К ним принадлежат спиртовые и хлебопекарные дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*, а также винные дрожжи из вида *Sacch. elipsoideus* (рис. 46). К низовым дрожжам относятся виды, используемые в пивоваренной промышленности. Уже Л. Пастер выяснил, что брожение есть жизнь без кислорода. Действительно, в природе не всегда доступен кислород, в присутствии которого из углеводов можно получить гораздо больше энергии, чем в процессе спиртового брожения. Поэтому, приспособившись к условиям жизни без кислорода, определенные культуры выработали сравнительно трудный путь получения энергии. В основе брожения лежит разрушение углеводов до этилового спирта,  $\text{CO}_2$  и  $\text{H}_2\text{O}$  по следующему суммарному уравнению:



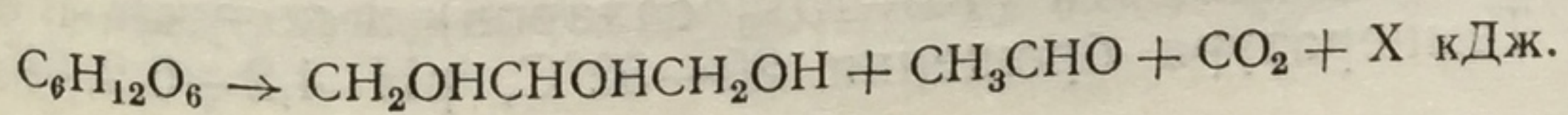
Начало катаболизма глюкозы идет по схеме гликолиза, в результате образуется пировиноградная кислота. При декарбоксилировании пировиноградной кислоты образуется ацетальдегид, в результате гидрогенизации которого образуется этиловый спирт по уравнению



На начальном этапе спиртового брожения ацетальдегид не является акцептором водорода. В этот период — период индукции — водород соединяется с глицеральдегидом, восстанавливая его до глицерина. В это время в среде накапливается глицерин, ацетальдегид и  $\text{CO}_2$ .

Когда в среде накапливается определенное количество ацетальдегида, ход реакций меняется и процесс переходит в фазу стационарного брожения, где акцептором водорода становится ацетальдегид и образуется этиловый спирт (рис. 47).

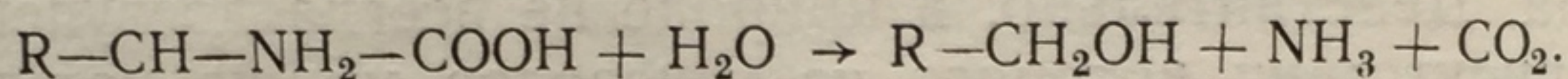
Если к питательной среде добавить сульфиты, которые связывают ацетальдегид, при брожении можно получить значительное количество глицерина, что и применяется в промышленности. В этом случае суммарное уравнение брожения сахара следующее:





В процессе спиртового брожения в среде могут накапливаться различные высшие спирты, которые в практике называют сивушными маслами.

В состав сивушных масел входят изоамиловый, амиловый и изобутиловый спирты. Существует мнение, что сивушные масла образуются из аминокислот, азот которых дрожжи используют по следующему уравнению:



Однако в последнее время это мнение подвергают критике и считают, что сивушные масла образуются из продукта гликоли-

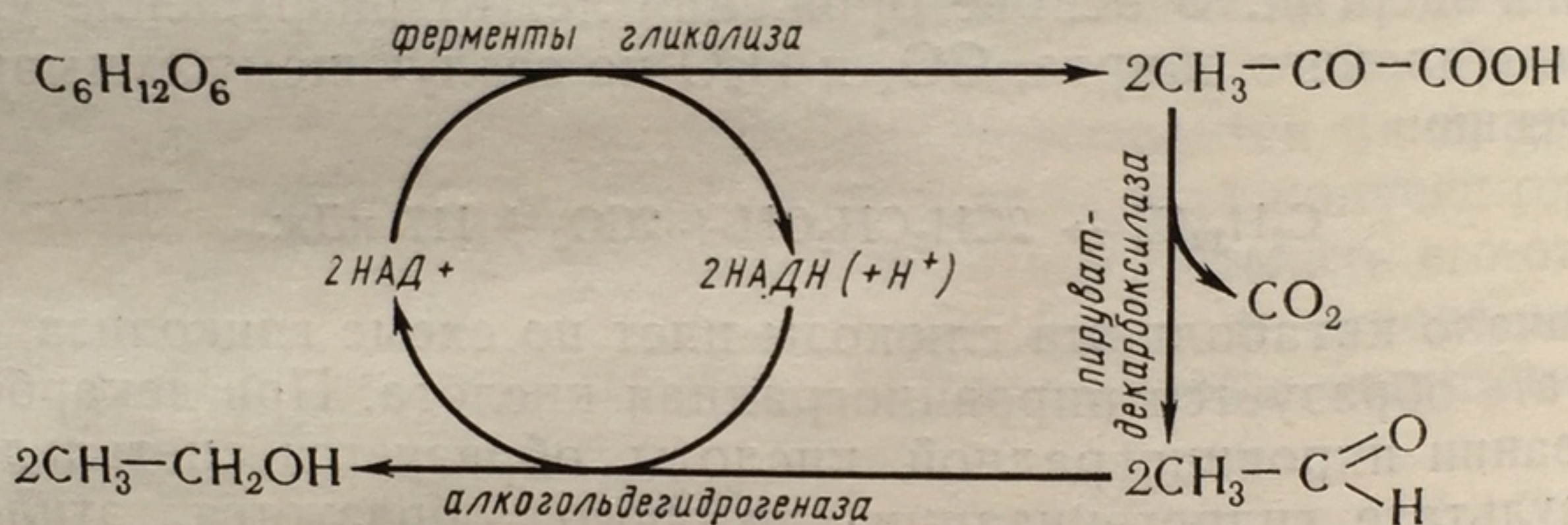


Рис. 47. Схема образования этилового спирта

за — пировиноградной кислоты путем аминирования ее до аланина, который в свою очередь переаминируется в соответствующую кетокислоту. В условиях спиртового брожения кетокислоты, восстанавливаясь, образуют высшие спирты.

**Получение этилового спирта.** Ранее спирт получали из крахмалсодержащих пищевых продуктов. В настоящее время разработана технология получения этилового спирта из сахаросодержащего и целлюлозосодержащего сырья.

При получении спирта из крахмалсодержащего сырья клейстеризованный крахмал осахаривают при помощи зеленого солода и ферментных препаратов, содержащих  $\alpha$ -амилазу,  $\beta$ -амилазу, глюкоамилазу.

$\alpha$ -Амилаза расщепляет амилозу и амилопектин до декстринов, их в свою очередь расщепляет до мальтозы  $\beta$ -амилаза, а до глюкозы — глюкоамилаза. При ферментативном гидролизе в клейстеризованном крахмале остается 20—30% промежуточных продуктов, которые гидролизуются в ходе брожения, поэтому необходимо сохранить ферменты до конца процесса брожения. Обычно в спирт сбраживают затор с 16—18%-ной концентрацией растворимых веществ (13—15% сахаров) и получают 8—9% спирта. Температура брожения 29—32°C, pH 4,2—5,2. Клетки



дрожжей вначале размножаются, затем при достижении 5%-ной концентрации спирта размножение прекращается.

В производстве процесс брожения ведут 2—3 сут. Динамика спиртового брожения показана на рис. 48.

Спирт-сырец далее подвергают ректификации и получают спирт-ректификат высшей степени очистки с содержанием спирта 96,2%.

При получении спирта из древесины перед гидролизом древесину размельчают до стружек следующих размеров: толщина 3 мм, ширина 10—70 мм и длина 25 мм. Гидролиз идет в больших (7,7—50 м<sup>3</sup>) гидролизных аппаратах, которые наполняют стружкой, добавляют 0,5%-ный раствор H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и вводят пар давлением 1—1,2 МПа (10—12 кгс/см<sup>2</sup>). Варка идет 40—50 мин. Выход сахара 45—48% от сухой массы древесины. Реакция среды полученного гидролизата кислая, pH 1,8—2,2, поэтому гидролизат нейтрализуют известковым молоком, в котором содержится 1,1—1,2 кг/л извести; в гидролизате сравнительно мало азота и фосфора, поэтому предварительно к каждому кубическому метру гидролизата добавляют 0,3 кг суперфосфата и 0,15 кг сульфата аммония. При температуре 85°C через гидролизат продувают воздух, pH устанавливают в пределах 5—6. Гипс осаждают, а прозрачную часть гидролизата после охлаждения используют для сбраживания.

Спирт получают и из мелассы. Предварительная подготовка питательной среды очень проста — мелассу разбавляют и добавляют питательные соли.

Для приготовления напитков используют спирт, полученный только из пищевого сырья.

Для технических нужд все чаще используют спирт, полученный из гидролизатов древесины, сульфитного щелока, или синтетический спирт.

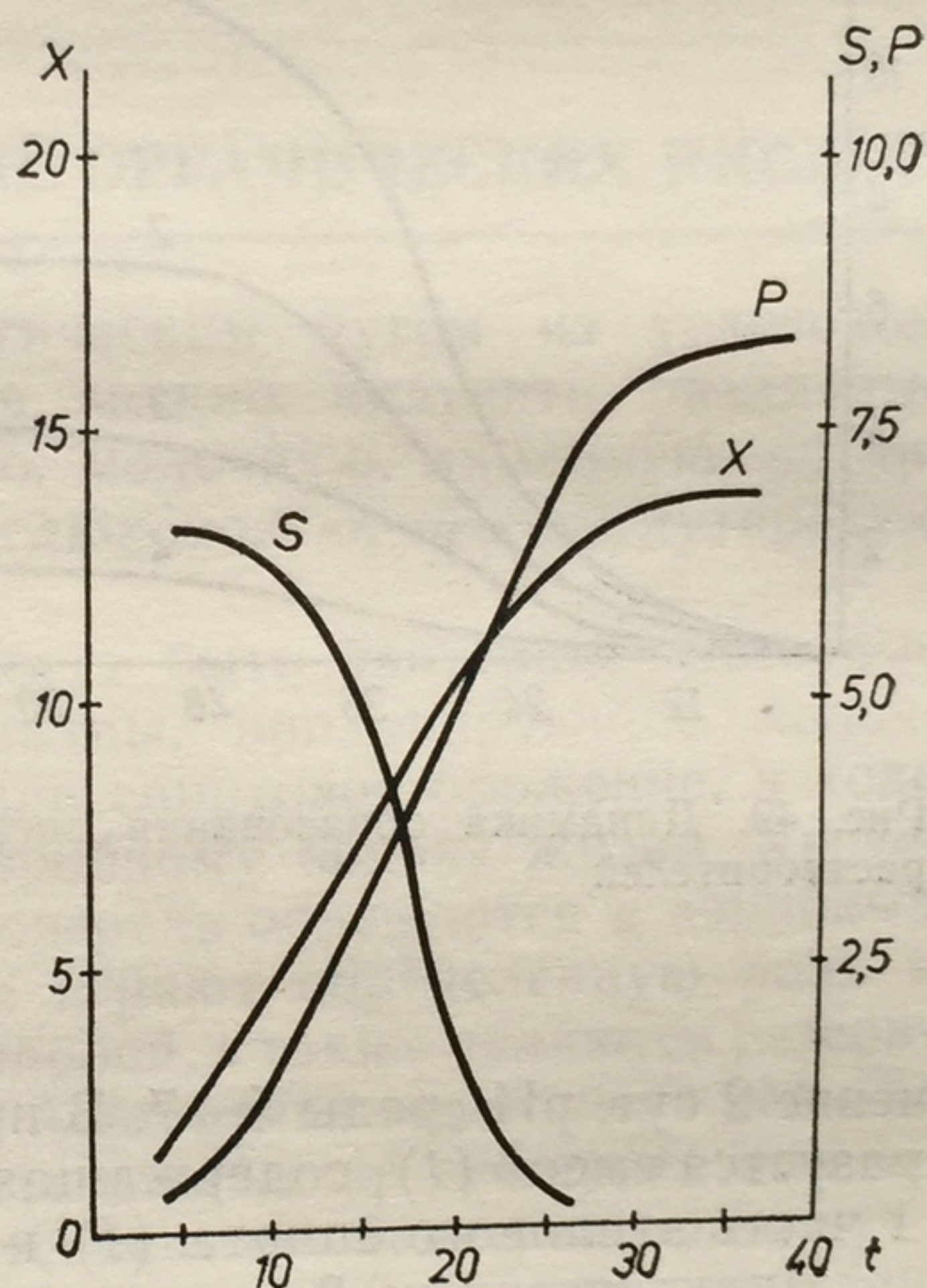


Рис. 48. Динамика спиртового брожения:

X — число дрожжевых клеток (10<sup>7</sup> мл), S — концентрация сахара (%), P — концентрация спирта (%), t — время (ч)



## ОРГАНИЧЕСКИЕ РАСТВОРИТЕЛИ

К числу органических растворителей относятся ацетон  $\text{CH}_3\text{—CO—CH}_3$  и бутиловый спирт  $\text{CH}_3\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{OH}$ . Их можно получить не только химическим путем, но и с помощью микробиологического синтеза.

Брожение ацетона и бутилового спирта является анаэробным процессом, вызывается бактериями *Clostridium acetobutylicum* или близкими к ним видами маслянокислых бактерий.

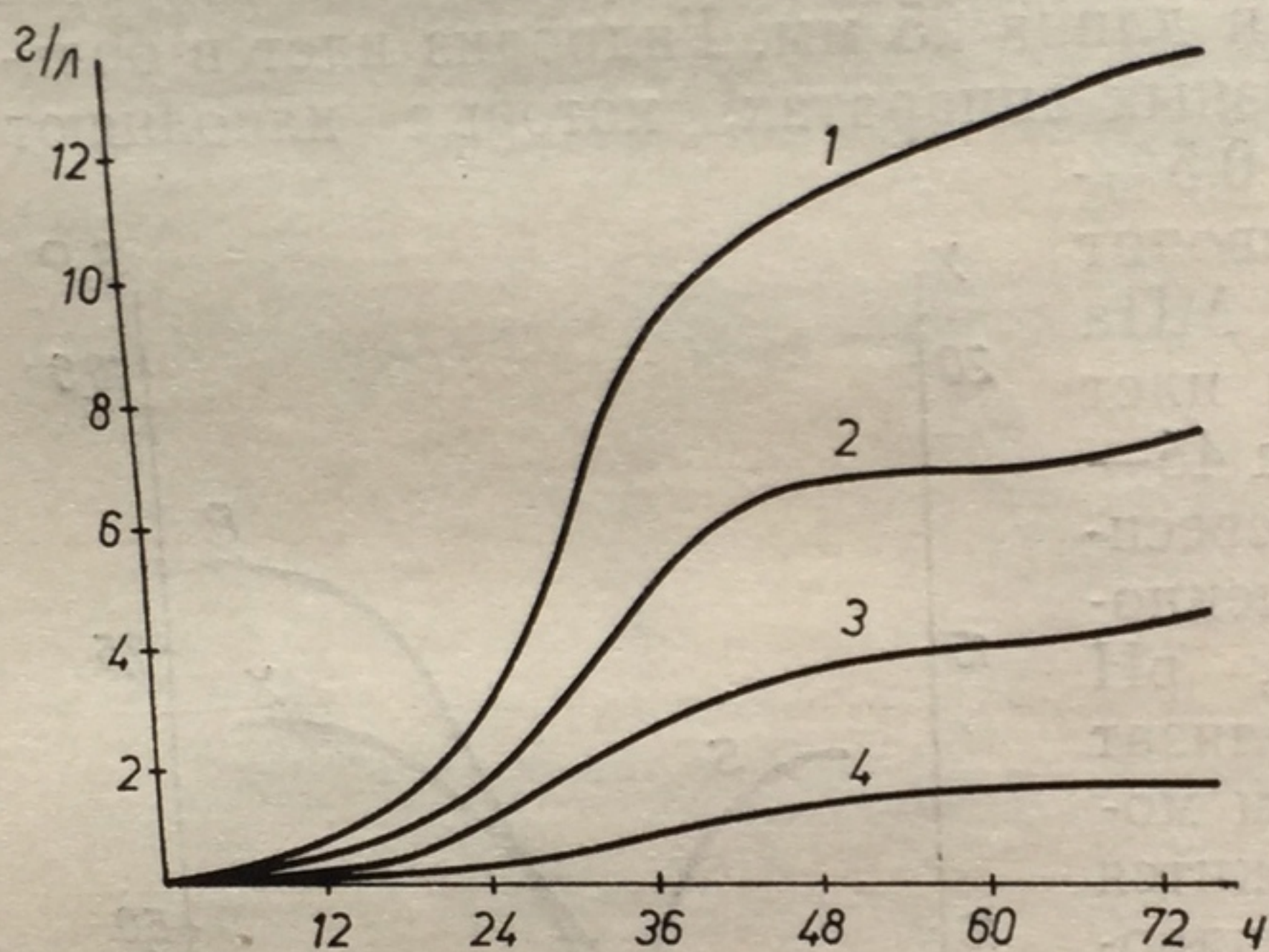


Рис. 49. Динамика образования органических растворителей

чение 2 сут, рН среды 5—7. В процессе брожения из глюкозы образуется смесь (1), содержащая 6 частей бутилового спирта (2), 1 часть этилового спирта (4) и 3 части ацетона (3) (рис. 49).

Практически из 3 кг крахмала получается 1 кг органических растворителей.

Разработаны методы получения ацетона и бутилового спирта из сульфитного щелока и гидролизатов древесины.

В ацетоно-бутиловом брожении в первый период образуется уксусная и масляная кислоты, выделяется водород и углекислый газ. Затем масляная кислота восстанавливается до бутилового спирта. Ацетон образуется из продукта конденсации уксусной кислоты — ацетонуксусной кислоты при декарбоксилировании.

Во время брожения в среде накапливается много рибофлавина, причем количество его тем больше, чем интенсивнее образуется ацетон. Разработаны способы получения кормового препарата рибофлавина из ацетоно-бутиловой барды после отделения органических растворителей. Для этого барду десятикратно

Ацетон и бутиловый спирт получают, сбраживая зерновые, мелассно-зерновые заторы или мелассу. Если среду готовят из зерна, например, кукурузы, то сначала получают муку грубого помола, ее смешивают с водой из расчета 6—8 кг муки на 100 л воды. Затем затор варят 2 ч под давлением 0,2 МПа и стерилизуют. Охлажденную до 37—42°C массу сбраживают в те-

Глава  
ПОЛУ  
Микр  
спиртов или даже углево  
органические кислоты — у  
тую, итаконовую, фума  
и др.  
Продуцентами этих  
грабы или дрожжи. Ми  
ную кислоту, а также в  
эволюции приспособили  
ная и лимонная кислот  
условиях. По-видимому  
борьбе с конкурирующ  
выми источниками угл  
завания сахара могут  
ную кислоту. В свою с  
ствии спирта в среде  
ее до воды и  $\text{CO}_2$ .

Уксусом называ  
 $\text{CH}_3\text{COOH}$  в воде. С  
уксусная кислота. С  
спиртовой раство  
(*Bacterium schutz*  
перебродившего  
сусной кислоты —  
или ледяной уксу



упаривают в многоступенчатых вакуум-аппаратах и затем высушивают в распылительных сушилках.

Так получают сухой концентрат, содержащий рибофлавина 60—100 мкг/г.

В Институте биохимии им. А. Баха АН СССР разработан метод получения ценного витаминного концентрата из ацетонобутиловой барды, путем дополнительного сбраживания ее метанообразующими бактериями, которые, используя часть сухих веществ, синтезируют витамин В<sub>12</sub>. В этих кормовых препаратах кроме рибофлавина содержится цианкобаламин.

## Глава VII

### ПОЛУЧЕНИЕ ОРГАНИЧЕСКИХ КИСЛОТ

Микробиологическим путем из углеводов, спиртов или даже углеводородов можно получить различные органические кислоты — уксусную, молочную, лимонную, янтарную, итаконную, фумаровую, глюконовую, α-кетоглутаровую и др.

Продуцентами этих кислот могут быть бактерии, плесневые грибы или дрожжи. Микроорганизмы, продуцирующие молочную кислоту, а также вызывающие спиртовое брожение, в ходе эволюции приспособились к анаэробному образу жизни. Уксусная и лимонная кислоты в свою очередь образуются в аэробных условиях. По-видимому, кислоты играют определенную роль в борьбе с конкурирующей микрофлорой, а также являются резервными источниками углерода. Так, *Aspergillus niger* после использования сахара могут использовать в качестве субстрата лимонную кислоту. В свою очередь уксуснокислые бактерии при отсутствии спирта в среде ассимилируют уксусную кислоту, окисляя ее до воды и CO<sub>2</sub>.

#### УКСУСНАЯ КИСЛОТА И УКСУС

Уксусом называется 5—9%-ный раствор уксусной кислоты CH<sub>3</sub>COOH в воде. Он был обнаружен в кислом вине раньше, чем уксусная кислота. Позже уксус начали получать, сбраживая спиртовой раствор при помощи особых уксуснокислых бактерий (*Bacterium schutzenbachii*, *Bact. curvum*). В результате перегонки перебродившего раствора получают 70—80%-ный раствор уксусной кислоты — уксусную эссенцию. Концентрация безводной или ледяной уксусной кислоты 99,8%.

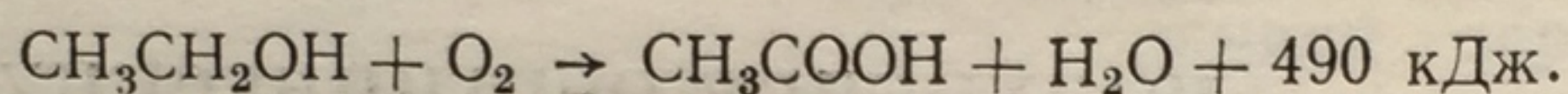


Уксусную кислоту используют как в пищевой промышленности, так и для растворения органических красителей, получения медикаментов, пластмасс, синтетических волокон, в микробиологическом синтезе как источник углерода и др.

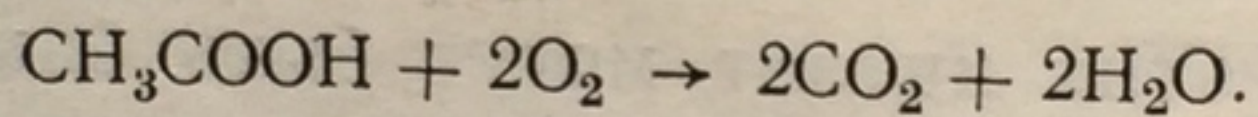
Для полученного микробиологическим путем уксуса характерны приятный аромат и вкус за счет образования в процессе брожения небольших количеств эфиров, например этилацетата, а также спиртов и кислот.

Уксуснокислые бактерии принадлежат к роду *Acetobacter*. Это длиной в 0,5—8,0 мкм грамотрицательные, образующие споры палочки с жгутиками.

Реакцию образования уксусной кислоты катализирует фермент алкогольоксидаза. Уравнение реакции имеет вид



Для этого процесса оптимальны реакция среды pH 3,0 и температура 28°C для культуры *Bact. schutzenbachii*, для культуры *Bact. curvum* — 35—37°C. Концентрация спирта в среде 7—15%, конечная концентрация кислоты 8—14% (в среднем 10%). Если в процессе брожения в среде кончается спирт, происходит окисление уксусной кислоты



Надо следить за тем, чтобы в конце процесса в среде содержалось 0,3—0,5% неиспользованного спирта. Во время брожения необходимо обеспечить хорошую аэрацию — теоретически на 46 частей по массе спирта необходимы 32 части кислорода.

В промышленности уксуснокислое брожение ведут в вертикальных генераторах по непрерывному методу. Генераторы заполняют специальной стружкой или другим наполнителем с большой площадью поверхности, например древесным углем, коксом и др. Раствор спирта подают в генератор сверху, воздух продувают снизу встречным потоком. Находящиеся на поверхности стружек бактерии окисляют спирт до уксусной кислоты.

Обычно диаметр генератора 1—3 м, высота 2,5—6 м. Генераторы делают из дерева, керамики или нержавеющей стали, стекла или железобетона, выложенного внутри керамическими плитками. При пуске генератор наполняют стружкой, подкисляя ее при помощи уксуса до тех пор, пока вытекающий из генератора уксус имеет ту же концентрацию, что и исходный раствор. Это длится примерно 8—10 сут. Затем начинается основной процесс ферментации. Для этого готовят среду, содержащую 6% уксуса, и добавляют 3%-ный раствор спирта. Кроме того, в среду вносят определенное количество фосфатов калия и сульфат аммония. Среду равномерно разливают в верхней части генератора и дают

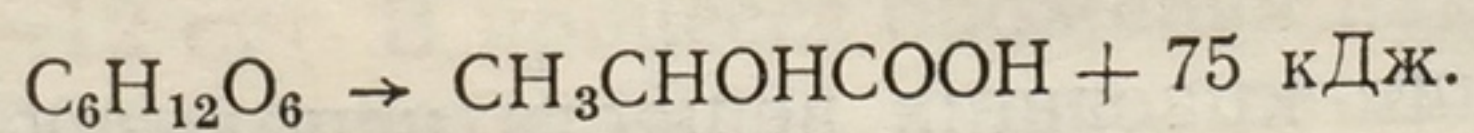


свободно стекать по стружкам. После стабилизации процесса каждый день в генератор добавляют среду в количестве 16—20% объема находящейся в нем жидкости. Без смены стружек процесс может длиться несколько лет. Производительность генератора 2,9 кг 100% уксусной кислоты на 1 м<sup>3</sup> стружек за сутки. Теоретически из 100 л безводного спирта можно получить 103 кг уксусной кислоты, практически получают 75—93 кг уксусной кислоты, так как имеют место потери вследствие переокисления, неполного окисления спирта, а также испарения. В настоящее время широко используют метод рециркуляции, по которому вытекающий раствор многократно возвращают в генератор.

### МОЛОЧНАЯ КИСЛОТА

На субстратах, содержащих углеводы, многие молочнокислые бактерии продуцируют молочную кислоту  $\text{CH}_3\text{—CHON—COOH}$ . Чаще всего они встречаются в молочных продуктах, на их деятельности основано получение простокваши, сметаны и других кисломолочных продуктов. Молочнокислые бактерии находятся и на зерне, поэтому ржаной хлеб можно получить после естественного брожения теста. В промышленности молочную кислоту получают, используя *Bacterium delbrückii* (синоним *Lactobacillus delbrückii*), которые принадлежат к термофильным бактериям с оптимумом температуры развития 45—50°C. В микроскопе они видны в виде длинных палочек.

Молочную кислоту широко используют в химической (получение пластмасс, красителей, чернил, лаков), фармацевтической и пищевой промышленности. Ферментные системы молочнокислых бактерий превращают глюкозу в молочную кислоту согласно уравнению



Вначале имеет место гликолиз, затем пировиноградная кислота восстанавливается под влиянием фермента лактатдегидрогеназы (рис. 50).

Молочную кислоту в промышленных условиях получают методом анаэробной глубинной ферментации. В качестве основного сырья используют мелассу, сахарозу, гидролизаты крахмала. Концентрация сахара в среде 5—20%, температура 48—50°C, pH 6,3—6,5. Во время ферментации pH среды поддерживают при помощи мела, который добавляют 3—4 раза в сутки.

На процесс молочнокислого брожения положительное влияние оказывают биологически активные вещества. С этой целью к среде добавляют вытяжку солодовых ростков. Продолжительность ферментации 7—11 сут.



По окончании ферментации в среде остается 0,5—0,1% сахара и 11—14% лактата кальция. Осадок мела и коллоиды отделяют фильтрованием или отстаиванием при 80—90°C. Фильтрат упаривают до концентрации 27—30%, затем охлаждают до 25—30°C и выдерживают в кристаллизаторах 36—48 ч. Кристаллы лактата отцентрифугировывают (выход их составляет 50—55%). Осуществляя кристаллизацию из слабых растворов, удастся увеличить выход кристаллов до 95%. В последнее время разработаны приемы непрерывной кристаллизации лактата.

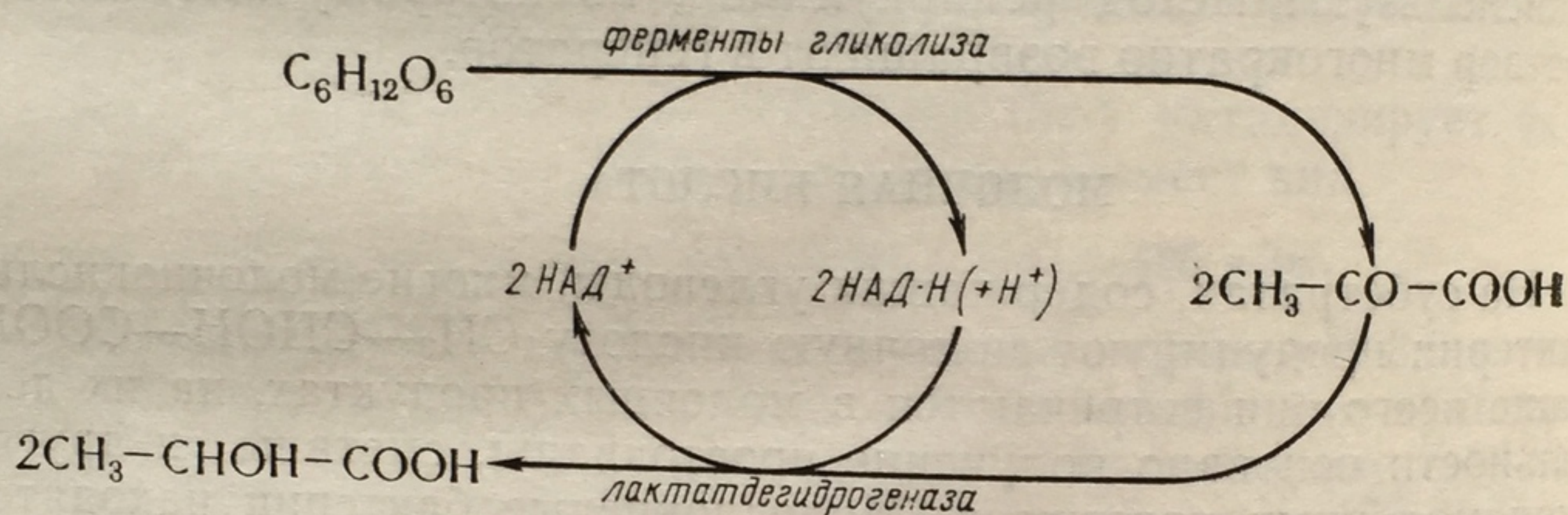
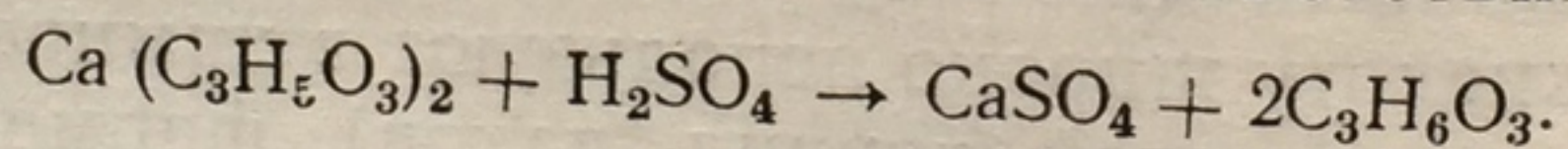


Рис. 50. Схема образования молочной кислоты

Молочную кислоту из лактата получают при помощи серной кислоты. Реакция идет при 60—70°C в соответствии с уравнением



Для отделения ионов железа сырец молочной кислоты при температуре 65°C обрабатывают желтой кровяной солью (выпадает берлинская лазурь). Тяжелые металлы осаждают сульфатом натрия.

Для адсорбции красящих веществ используют активированный уголь и затем проводят концентрирование массы до 50% или 80% в вакуум-аппаратах при давлении 800—920 кПа. Молочную кислоту дополнительно обрабатывают еще раз активным углем, фильтруют и фасуют.

### ПРОПИОНОВАЯ КИСЛОТА

Пропионовую кислоту  $CH_3-CH_2-COOH$  продуцируют пропионовокислые бактерии. В производстве сыра они способствуют образованию специфического вкуса. Пропионовую кислоту как растворитель используют в производстве душистых веществ. В химико-фармацевтической промышленности она используется в качестве сырья. Для промышленного получения пропионовой

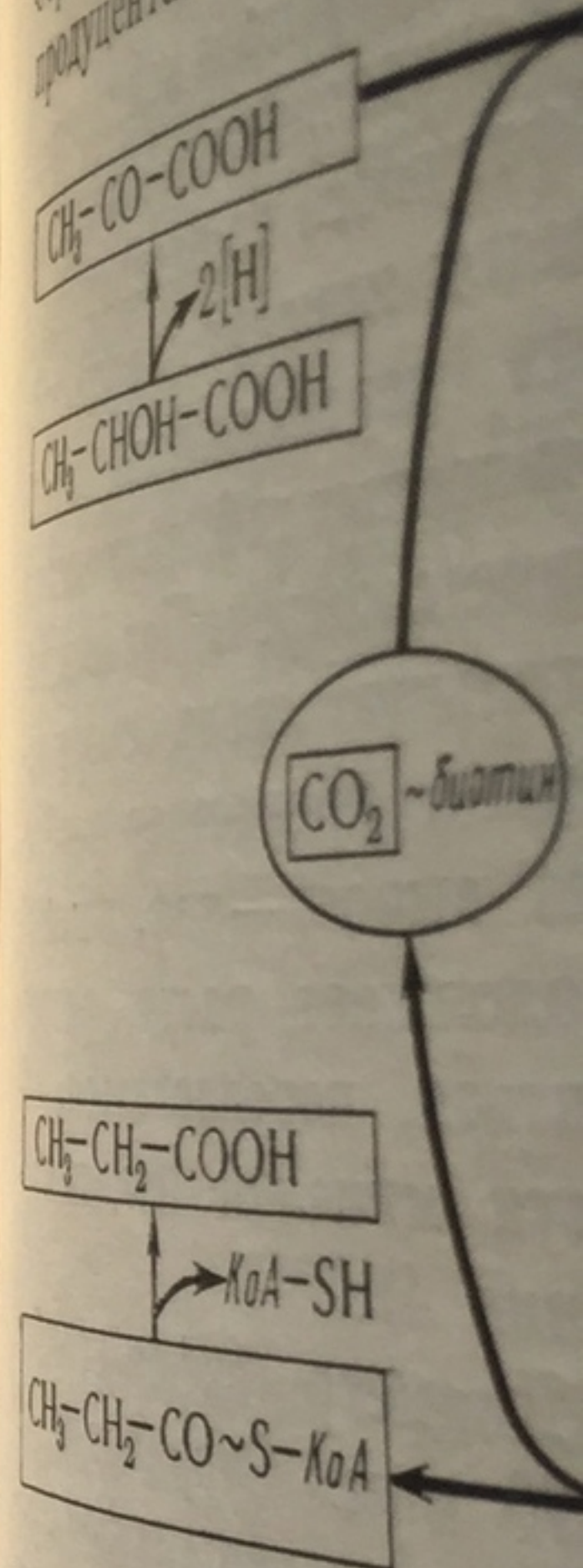


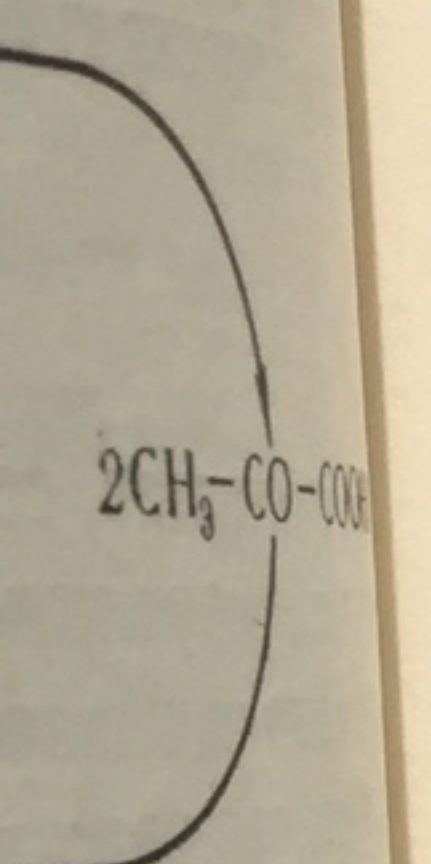
Рис. 51. Схема образования п...

Пропионовую кислоту получают в результате ферментации глюкозы. В процессе используют культуру бактерий, содержащую 2% глюкозы. Процесс идет в нейтральной среде при 30°C, длится 7—12 сут. Примерно 75% сахара превращается в пропионовую кислоту и на образование...

Лимонная кислота широко распространена в природе. В Италии и Испании производят из лимонов. Ее используют для производства ароматических веществ. В фотоэмульсиях...



0,5—0,1%  
оллонды от  
С. Фильтрат  
дают до 25—  
Кристаллы  
ет 50—55%).  
ров, удаётся  
время разрабо  
а.



от при помощи сер  
ветствии с уравнени  
 $2C_3H_6O_3$   
молочной кислоты  
кровяной солью  
ы осаждают сульф  
активир

$2C_3H_6O_3$ .  
молочной кислоты  
кровяной солью  
ы осаждают сульф  
пользуют активиро  
ание массы до 50  
00—920 кПа. Мол  
е раз активным

ООН продуциру  
е сыра они спосо  
ропионовую кис  
дстве душистых  
нности она исп  
получения про

ООН продукция  
е сыра они спосо  
ропионовую кис  
дстве душистых  
нности она исп  
получения про

ООН продукция  
е сыра они спос  
ропионовую кл  
дстве душистых  
нности она исп  
олучения про



Лимонную кислоту микробиологическим методом получают, используя главным образом микроскопические плесневые грибы *Aspergillus niger* (рис. 52), выращиваемые методом поверхностного культивирования.

*Aspergillus niger* размножается как вегетативно, так и при помощи спор, которые образуются на конце выростов конидиеносцев-стеригм в виде прямых цепочек. Конидиеносцы *Aspergillus*

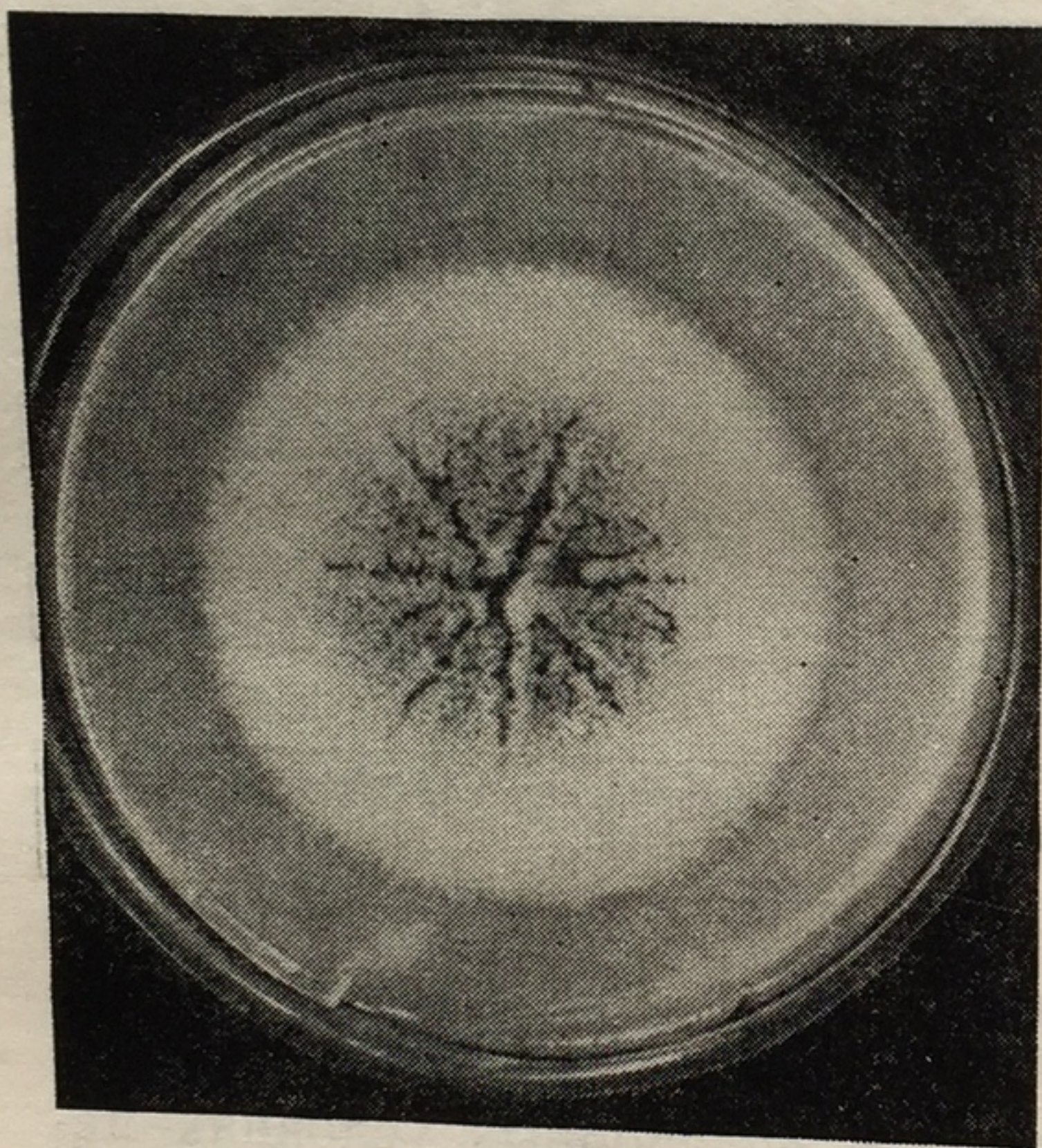


Рис. 52. Колония *Aspergillus niger*

образуются из вегетативных клеток мицелия в виде прямых вертикальных, неразветвленных гиф, имеющих на конце пузырьки. Попадая в питательную среду, спора набухает, прорастает и образует вырост — гиф, который продолжает расти, разветвляться, переплетаться, образуя мицелий (см. приложение 4).

Диаметр гифов грибов 1—20 мкм. Оторванные от мицелия частицы гифов продолжают расти самостоятельно, вегетативно образуя новый мицелий.

Раньше для получения лимонной кислоты главным исходным веществом была сахароза. Теперь во всем

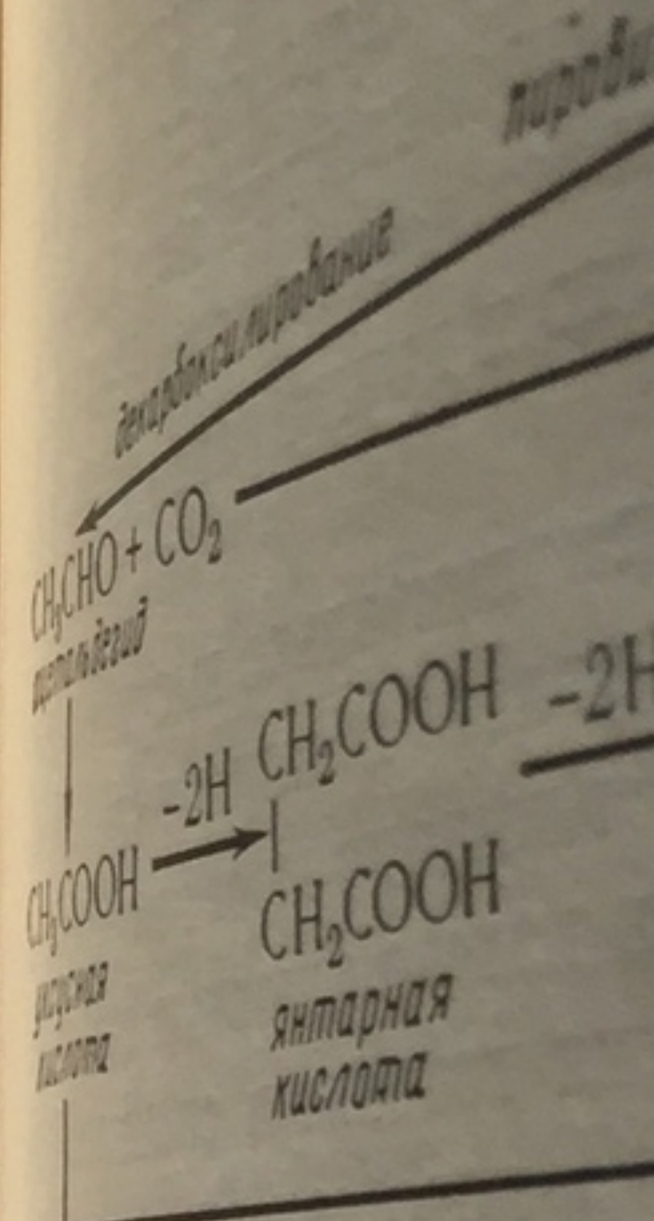
Советском Союзе лимонную кислоту получают из мелассы по методу, разработанному в Риге.

Химизм процесса образования лимонной кислоты связан с реакциями цикла Кребса.

Из схемы видно, что лимонная кислота образуется из уксусной и щавелевоуксусной кислот.

Экспериментально из потребленного сахара получают 98% лимонной кислоты, однако на практике выход продукта меньше, так как всегда имеют место различные побочные процессы. В культуральной жидкости можно обнаружить не только кислоты цикла Кребса — аконитовую, янтарную, фумаровую и яблочную, но иногда до 0,5% глюконовой, сахарной, щавелевой и малоновой кислот.

Технология производства лимонной кислоты из мелассы методом поверхностного культивирования показана на рис. 53. В отдельном цехе выращивают посевной материал — споры (кони-



для *Aspergillus niger*. За 2-3 суток в пробирках, колбах и алюмо-дой стадии 2—4 сут, выр-используют твердую агар-весах — жидкую среду.

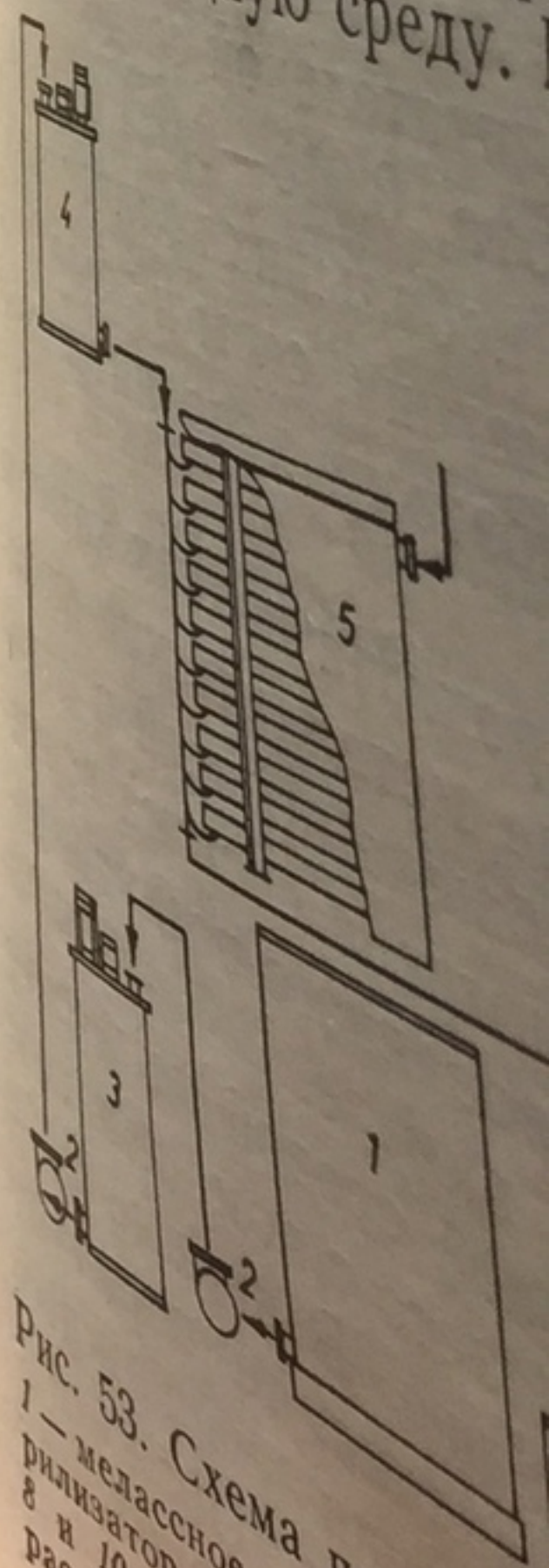
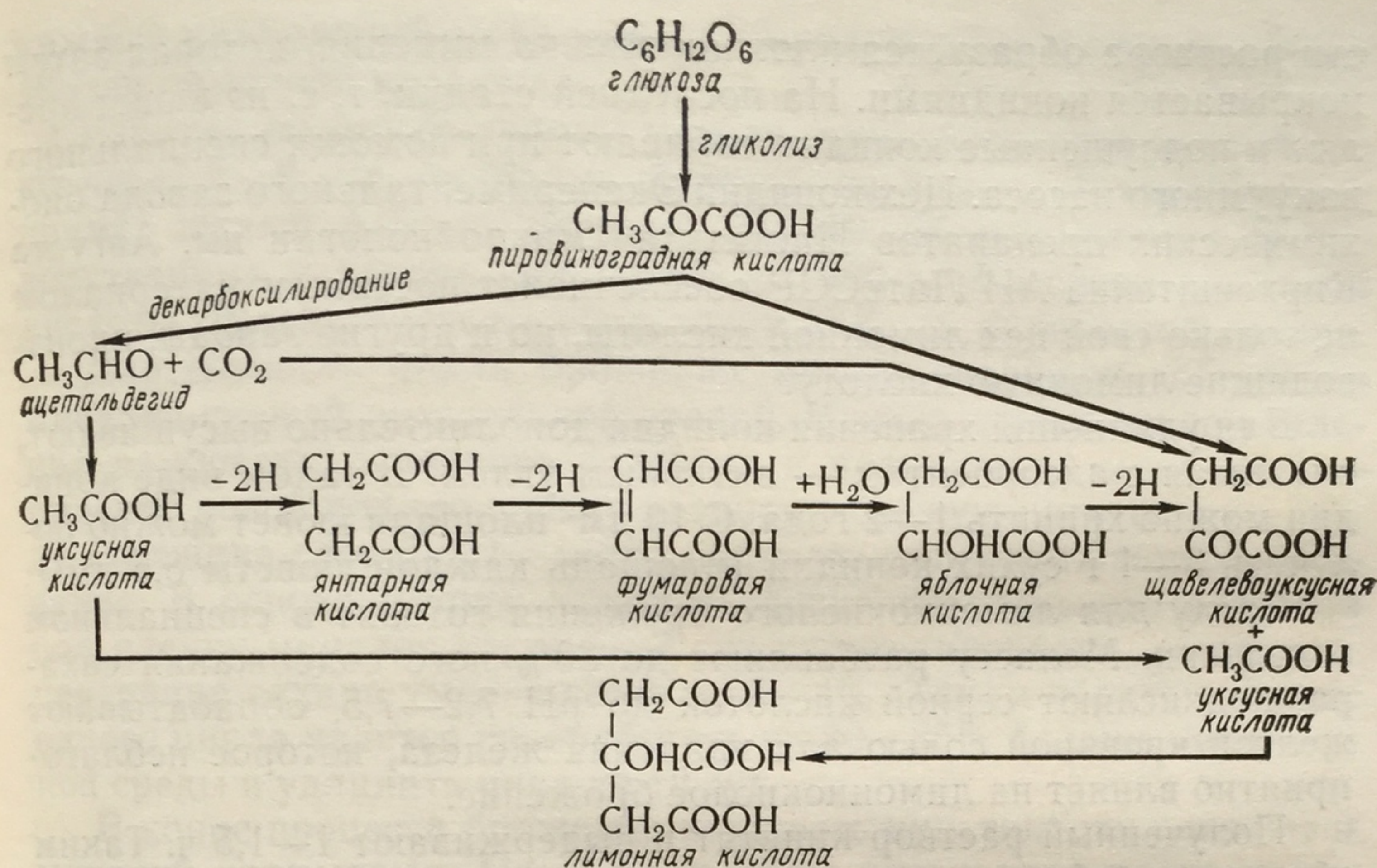


Рис. 53. Схема получения лимонной кислоты из мелассы. 1 — мелассное хранилище, 2 — посевной материал, 3 — ферментер, 4 — посевной материал, 5 — камера брожения, 6 и 7 — фильтры, 8 — насос, 9 — насос, 10 — насос, 11 — насос, 12 — насос, 13 — насос, 14 — насос, 15 — насос, 16 — насос, 17 — насос, 18 — насос, 19 — насос.





дии) *Aspergillus niger*. Затем размножают его в трех стадиях — пробирках, колбах и алюминиевых кюветах. Длительность каждой стадии 2—4 сут, выращивание идет при 32°C. В пробирках используют твердую агаризованную сусло-среду, а в колбах и кюветах — жидкую среду. Во время культивирования на поверхно-

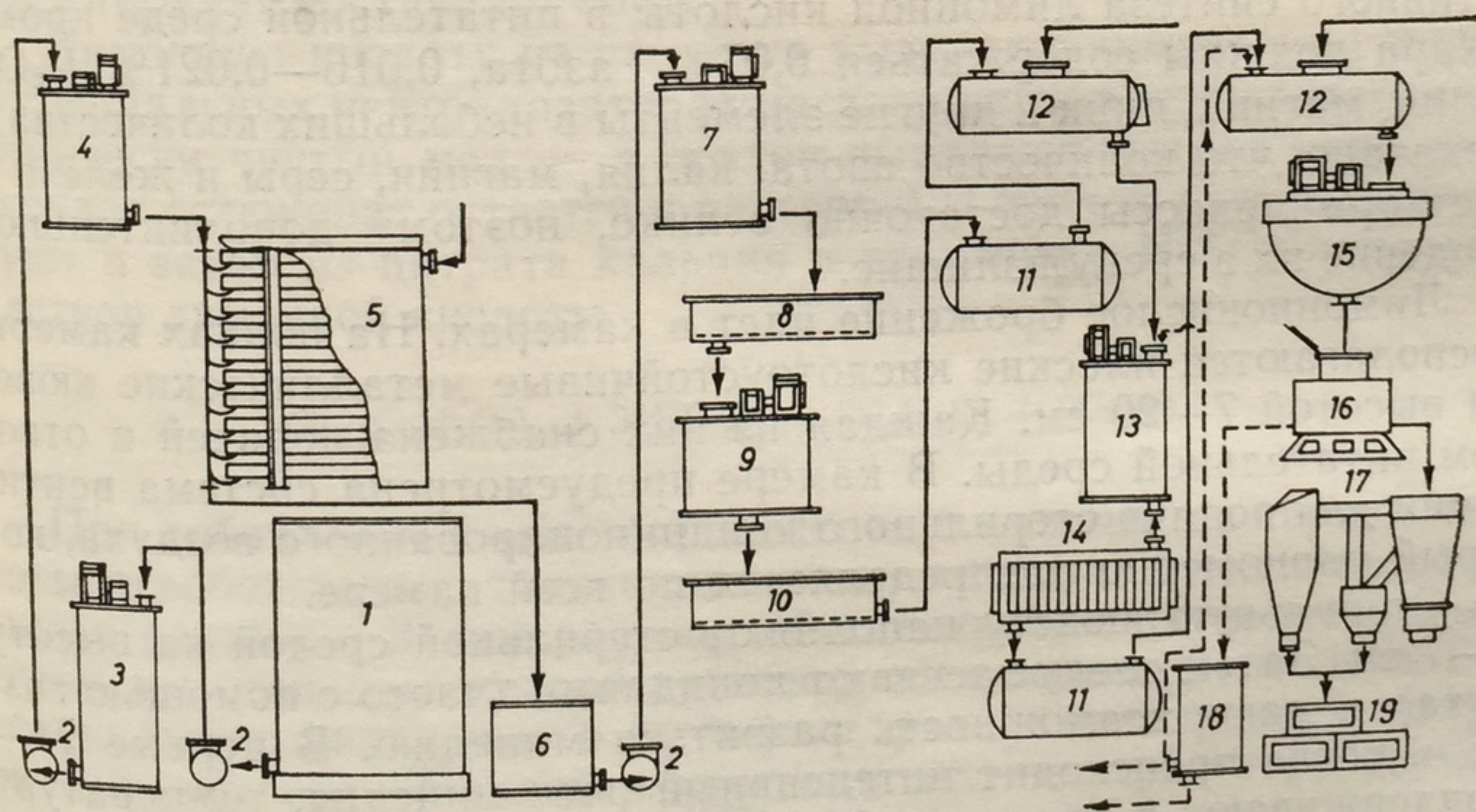


Рис. 53. Схема получения лимонной кислоты:

1 — мелассное хранилище, 2 — насосы, 3 — резервуар для растворения мелассы, 4 — стерилизатор, 5 — камера брожения, 6 — сборник сброженной жидкости, 7 — нейтрализатор, 8 и 10 — нутч-фильтры, 9 — реактор, 11 — сборник, 12 — вакуум-аппарат, 13 — повторный растворитель, 14 — фильтр-пресс, 15 — кристаллизатор, 16 — центрифуга, 17 — сушилка, 18 — сборник, 19 — готовая продукция.



сти раствора образуется плотная пленка мицелия, которая затем покрывается конидиями. На последней стадии, т. е. из кювет зрелые и подсушенные конидии собирают при помощи специального вакуумного насоса. Цех конидий Экспериментального завода биохимических препаратов Института микробиологии им. Августа Кирхенштейна АН ЛатвССР обеспечивает посевным материалом не только свой цех лимонной кислоты, но и другие заводы, производящие лимонную кислоту.

Для удлинения хранения конидии дополнительно высушивают, смешивая с адсорбентом — активным углем. В таком виде конидии можно хранить 1—2 года. С 10 дм<sup>2</sup> площади кювет можно получить 3—4 г сухих конидий (площадь каждой кюветы 8,5 дм<sup>2</sup>).

Среду для лимоннокислого брожения готовят в специальном отделении. Мелассу разбавляют до 30%-ного содержания сахара, подкисляют серной кислотой до рН 7,2—7,5, обрабатывают желтой кровяной солью для удаления железа, которое неблагоприятно влияет на лимоннокислое брожение.

Полученный раствор кипятят и выдерживают 1—1,5 ч. Таким образом освобождаются от вредной микрофлоры. Перед переводом в бродильную мелассный раствор разбавляют до оптимальной концентрации сахара (15%). К среде всегда добавляют источники фосфора, обычно в виде солей фосфорной кислоты, и другие минеральные вещества, например сульфат цинка, стимулирующий образование мицелия и биосинтез лимонной кислоты. Для активного синтеза лимонной кислоты в питательной среде кроме сахара должны содержаться 0,07% азота, 0,016—0,021% Р<sub>2</sub>О<sub>5</sub>, калий, магний, цинк и другие элементы в небольших количествах. Доказано, что количество азота, калия, магния, серы и железа в растворе мелассы достаточно велико, поэтому дополнительное введение их в среду излишне.

Лимоннокислое брожение идет в камерах. На полках камеры располагаются плоские кислотоустойчивые металлические кюветы высотой 7—20 см. Каждая из них снабжена подачей и отводящим питательной среды. В камере предусмотрена система вентиляции для подачи стерильного кондиционированного воздуха, который равномерно распределяется по всей камере.

Стерильную кювету наполняют стерильной средой на высоту 4—7 см. Затем среду засевают конидиями (часто с помощью воздуха) и дают возможность развиться мицелию. В первые 24—36 ч, когда происходит интенсивный рост мицелия, температуру поддерживают в пределах 34—36°C. Для аэрации на каждый квадратный метр мицелия подают 3—4 м<sup>3</sup>/ч воздуха. Позже подачу воздуха увеличивают (12—15 м<sup>3</sup>/ч), а температуру снижают до 32—34°C. Максимальный рост мицелия достигается на 4-е сутки, а кислота интенсивнее всего синтезируется на 5-е сутки, когда

каждый квадратный метр  
105 г лимонной кислоты  
Работая по безобменно  
ит через 8—9 сут. Активн  
пример штамм *Aspergillus*  
высоких условиях  
кислоты. Выход кислоты  
Длительность цикла  
мицелий свежей питатель  
из кюветы основного  
растворной водой под его пл  
ду (толщина слоя 6 см) —  
вание. В основе метода  
под пленку мицелия чер  
концентрация сахара умень  
одного цикла удается пе  
ной среды и удлинить ци  
В конце процесса бро  
мицелий промывают. П  
целий после высушиван  
или для получения фер  
В 1 л жидкости ку  
кислоты, 3 г глюконово  
броженного сахара. Т  
лот лимонная составля  
Лимонную кислоту  
В специальных нейтра  
химически чистый ме  
оксалат (глюконат ос  
руют и затем из цит  
раствор лимонной ки  
  
Ca<sub>3</sub>(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>)<sub>2</sub>  
При добавлении  
лоты освобождаются  
ется в растворе. За  
углем, и с помощью  
рячую массу филь  
промывают горяче  
ной кислоты.  
В Риге разрабо  
при помощи ионо  
лимонной кислоты  
ного веса 1,25, за



каждый квадратный метр мицелия продуцирует в среднем 100—105 г/ч лимонной кислоты.

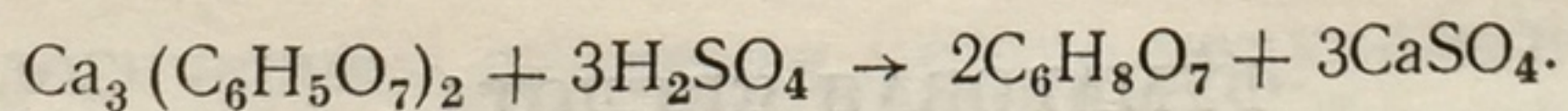
Работая по безобменному методу, цикл брожения заканчивают через 8—9 сут. Активные продуценты лимонной кислоты, например штамм *Aspergillus niger* ЭУ-119, обеспечивают в производственных условиях получение до 1400 г/м<sup>2</sup> в сутки лимонной кислоты. Выход кислоты составляет 68% от количества сахара.

Длительность цикла брожения можно увеличить, обеспечив мицелий свежей питательной средой. В этом случае после удаления из кюветы основного раствора и промывания мицелия стерильной водой под его пленку заливают свежую питательную среду (толщина слоя 6 см) — метод доливок — и продолжают сбраживание. В основе метода лежит введение питательного раствора под пленку мицелия через 6—7 сут культивирования, когда концентрация сахара уменьшается до 3—4%. Таким образом, в ходе одного цикла удается переработать на 30—35% больше питательной среды и удлинить цикл до 12 сут.

В конце процесса брожения жидкость культивации сливают и мицелий промывают. Промывные воды используют далее, а мицелий после высушивания используют для нужд животноводства или для получения ферментного препарата пектиназы.

В 1 л жидкости культивации содержится 40—50 г лимонной кислоты, 3 г глюконовой кислоты, 1 г щавелевой кислоты и 7 г несброженного сахара. Таким образом, из общего количества кислот лимонная составляет 90%.

Лимонную кислоту из раствора выделяют химическим путем. В специальных нейтрализаторах раствор нейтрализуют, добавляя химически чистый мел — в осадок выпадают цитрат кальция и оксалат (глюконат остается в растворе). Горячий раствор фильтруют и затем из цитрата кальция в реакторе с H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> получают раствор лимонной кислоты



При добавлении строго определенного количества серной кислоты освобождается только лимонная кислота, а оксалат остается в растворе. Затем раствор обесцвечивают активированным углем, и с помощью желтой кровяной соли осаждают железо. Горячую массу фильтруют в нутч-фильтрах. Осадки на фильтре промывают горячей водой и присоединяют ее к раствору лимонной кислоты.

В Риге разработан метод очистки раствора лимонной кислоты при помощи ионообменных смол (КУ-1, КУ-2, СБС-1). Раствор лимонной кислоты выпаривают в вакуумных аппаратах до удельного веса 1,25, затем на фильтр-прессах в горячем виде отделяют



осадок гипса. Второй раз раствор упаривают до 80% концентрации.

Сгущенный раствор подают на кристаллизаторы, где его охлаждают до 8—16°C. Образовавшиеся кристаллы центрифугируют и сушат, так как влажность их 2—3%.

В последнее время в производстве лимонной кислоты способ поверхностного культивирования начинает сменяться глубинным культивированием. Разработан метод получения лимонной кислоты из жидких парафинов, используя специальные культуры дрожжей.

### ГЛЮКОНОВАЯ КИСЛОТА

Глюконовую кислоту  $\text{CH}_2\text{OH}(\text{CHOH})_4\text{COOH}$  используют для получения ряда медикаментов. Кальциевая соль глюконовой кислоты легко усваивается в организме и служит источником кальция. Глюконовую кислоту чаще всего получают, используя грибы родов *Penicillium* и *Aspergillus*. Продуценты глюконовой кислоты содержат активный фермент — глюкозооксидазу, катализирующий окисление альдегидной группы в молекуле глюкозы.

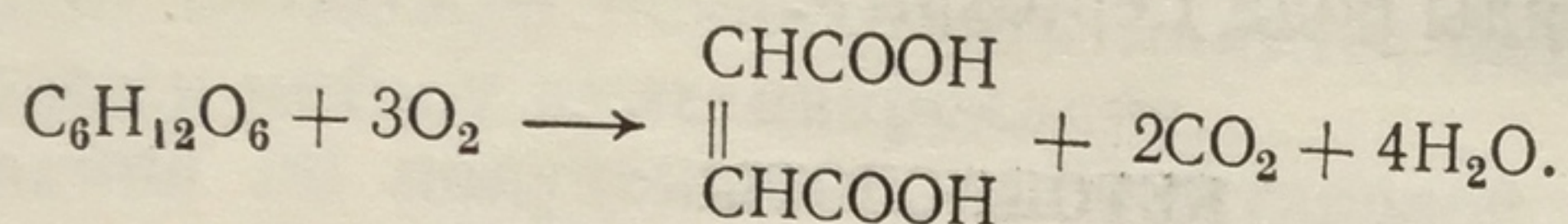
Процесс ферментации можно вести по методу как поверхностного, так и глубинного культивирования, используя концентрированные (до 35%) растворы глюкозы. При получении глюконовой кислоты источниками углерода могут быть мальтоза, манноза, маннит; сахароза, лактоза и фруктоза для этих целей не годятся. В аэробных условиях выход глюконовой кислоты от количества глюкозы составляет 90%. При работе с концентрированными растворами глюкозы к среде добавляют соединения бора и мел. Небольшое количество бора задерживает осаждение глюконата кальция во время ферментации.

### ФУМАРОВАЯ КИСЛОТА

Фумаровая кислота  $\text{HOOC}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$  легко превращается в ангидрид малеиновой кислоты, имеющий большое значение в производстве лаков и красок. Кислоту продуцируют многие виды плесневых грибов, особенно активна культура *Rhizopus nigricans*, поэтому ее используют для получения фумаровой кислоты как методом глубинного, так и поверхностного культивирования на глюкозосодержащих субстратах. Процесс ферментации имеет две фазы: в первой фазе при росте мицелия культуру обеспечивают полноценной средой, содержащей азот и другие вещества, а во второй фазе при образовании кислоты мицелий обеспечивают средой, содержащей только источник углерода.



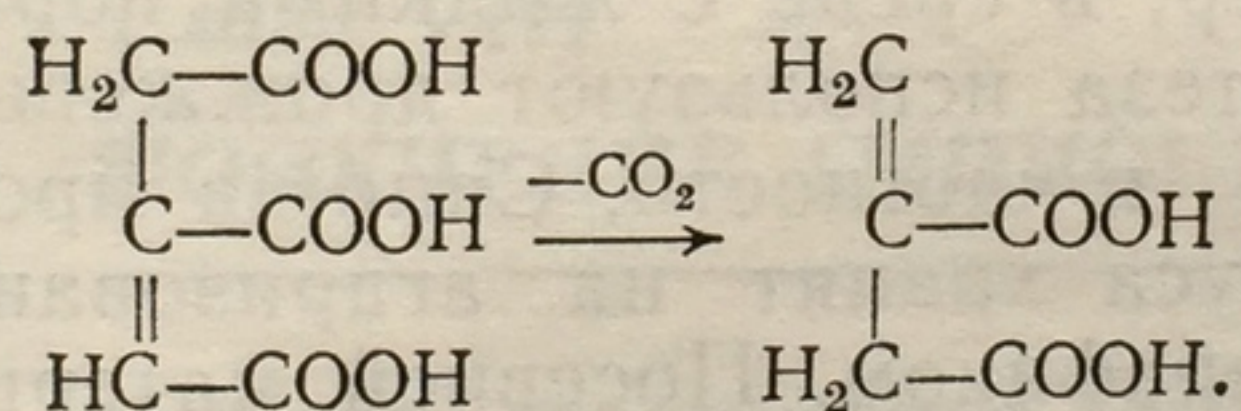
Фумаровая кислота — промежуточный продукт цикла Кребса. Ее образование из глюкозы отражает суммарное уравнение



### ИТАКОНОВАЯ КИСЛОТА

Итаконовая кислота  $\text{CH}_2=\text{C}(\text{COOH})-\text{CH}_2(\text{COOH})$  — ценное исходное вещество для производства синтетического нитронного волокна. На Экспериментальном заводе биохимических препаратов Института микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР разработан метод получения итаконовой кислоты из сахарозы при помощи культуры *Aspergillus terreus*. Этот метод уже освоен в производстве. Технологическая схема получения итаконовой кислоты очень похожа на схему получения лимонной кислоты. Доказано, что итаконовую кислоту можно производить по методу глубинного или поверхностного культивирования, причем вместо сахарозы можно использовать мелассу и даже продукты гидролиза древесины. Биосинтез итаконовой кислоты также связан с реакциями цикла Кребса.

В биосинтезе итаконовой кислоты исходным продуктом является цис-аконитовая кислота, при декарбоксилировании которой она образуется:



### ЦИКЛИЧЕСКИЕ КИСЛОТЫ

Микробиологическим синтезом можно получить и циклические кислоты — триоксибензойную (галловую) и 5-окси-2-оксиметил-γ-пирон (койевую).

Галловая кислота используется в промышленности красок для производства чернил, а также в медицине для лечения кожных болезней.

Эту кислоту продуцируют культуры родов *Penicillium* и *Aspergillus* из содержащегося в различных природных продуктах танина. Реакцию катализирует фермент манназа.

Койевую кислоту продуцируют главным образом виды рода *Aspergillus* на средах, содержащих крахмал, декстрин, дисахариды, моносахариды, многоатомные спирты или другие источники углерода. В основе образования койевой кислоты лежит окисле-



ние и дегидратация глюкозы. Койевая кислота обладает свойствами антибиотиков. В концентрации 1 : 1000000 она уничтожает некоторые виды рода *Leptospira*.

### КЕТОКИСЛОТЫ

В процессах биохимического разрушения углеводов — гликолизе и цикле Кребса значительное место занимают кетокислоты — пировиноградная и  $\alpha$ -кетоглутаровая. Пировиноградную кислоту образуют многие микроорганизмы, главным образом на глюкозных средах.

$\alpha$ -Кетоглутаровую кислоту тоже можно получить из глюкозы, например используя культуру *Pseudomonas fluorescens*. Посевной материал готовят на среде, содержащей 5—2% глюкозы, пептон, дрожжевой экстракт, мочевины, мел и свиной жир. Среду интенсивно аэрируют и выдерживают 2 сут при 30°C. Основная ферментация — в 10%-ной глюкозной среде сходного состава при 25°C в условиях умеренной аэрации. За 2—3 сут из 100 г глюкозы в процессе ферментации получают 16—17 г  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты. Пировиноградная и  $\alpha$ -кетоглутаровая кислоты являются предшественниками аминокислот — аланина и глутаминовой кислоты соответственно.

$\alpha$ -Кетоглутаровую кислоту некоторые микроорганизмы продуцируют на средах, содержащих не только углеводы, но и углеводороды, например, в среде с жидкими нормальными парафинами. Для биосинтеза используют дрожжевые культуры дефицитные по тиамину, в частности, *Candida lipolytica* и *C. rugosa*. Дрожжи *C. lipolytica* хранят на агаризованной минеральной среде Ридера с парафином. Посевной материал готовят в колбах на качалках на среде состава, %:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ —0,3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ —0,07,  $\text{NaCl}$ —0,05,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ —0,04,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ —0,1,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ —0,11, жидкий парафин—0,8, вода водопроводная кипяченая — до 100.

Посевной материал (5% от количества среды) высевают на среду следующего состава (%): мочевины — 0,5—0,1;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  — 0,07;  $\text{NaCl}$  — 0,05,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  — 0,04;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  — 0,01;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  — 0,1; жидкий парафин — 2,4; вода водопроводная до 100. В среду вводят тиамин или 4-амин-5-оксиметил-2-метил — пиримидин в концентрации 0,4 мкг/л.

Процесс ведут при 28—30°C, pH 4,0—4,5, аэрации — 0,25 объемов воздуха на 1 объем среды в минуту. Продолжительность ферментации 6—7 сут.

Содержание  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты в среде в конце процесса около 20 г/л, что соответствует выходу 88% от массы взятого парафина.



Одновременно в среде накапливается 8 мкг/л рибофлавина. Выход биомассы составляет 2,9 г/л по сухой массе.

В принципе возможно осуществить данную ферментацию и по непрерывному методу культивирования.

Исследования по получению  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты из эмульгированных парафинов при помощи дрожжей *Candida lipolytica* в проточном режиме показали, что в одноступенчатом процессе при скорости потока  $D=0,05 \text{ ч}^{-1}$  удается превысить продуктивность периодической культуры. Однако в данных условиях низкой остается концентрация продукта (2—3 г/л). В двухступенчатом непрерывном процессе концентрация повышалась до 5 г/л, что, однако, значительно ниже результатов с использованием периодической культуры (до 20 г/л в течение 96 ч). Более перспективным оказался двухступенчатый процесс, когда на первой ступени в проточном режиме получают биомассу, которая используется во второй (периодической) ступени в качестве инокулята.

Доказано, что  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту используют микроорганизмы, синтезирующие лизин и глутаминовую кислоты. Следовательно, используя  $\alpha$ -кетоглутаровую кислоту, есть возможность организовать биосинтез многих важных веществ на базе продуктов нефти.

## Глава VIII

### ПОЛУЧЕНИЕ АМИНОКИСЛОТ

#### МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ АМИНОКИСЛОТ

В состав природных белков обычно входят следующие аминокислоты: аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глицин, глутаминовая кислота, гистидин, глутамин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, оксипролин, пролин, серин, тирозин, треонин, триптофан и валин. Восемь аминокислот организм животных не может синтезировать, поэтому их называют биологически незаменимыми аминокислотами. К ним относятся фенилаланин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, триптофан и валин. Эти аминокислоты должны регулярно и в нужном количестве поступать в организм вместе с пищевыми продуктами. Недостаток одной из этих аминокислот в пище может стать фактором, лимитирующим рост и развитие организма. В табл. 15 показано химическое строение незаменимых аминокислот и рекомендуемое для человека количество их в сутки.



Таблица 15. Незаменимые аминокислоты и глутаминовая кислота

Принятое в практике название	Химическая формула	Химическое название	Рекомендуемая суточная норма для человека
Изолейцин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\alpha$ -Амино- $\beta$ -метил-валериановая кислота	1,4
Лейцин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\alpha$ -Амино-изокапроновая кислота	2,2
Лизин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-\text{COOH} \\   \qquad \qquad   \\ \text{NH}_2 \qquad \qquad \text{NH}_2 \end{array}$	$\alpha$ , $\epsilon$ -Диаминокапроновая кислота	1,6
Метионин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{S}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\alpha$ -амино- $\gamma$ -метилтиомасляная кислота	2,2
Треонин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\   \qquad   \\ \text{OH} \quad \text{NH}_2 \end{array}$	$\alpha$ -Амино- $\beta$ -оксимасляная кислота	1,0
Триптофан	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\alpha$ -Амино- $\beta$ -3-индолпропионовая кислота	0,5
Валин	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{CH}-\text{CH}-\text{COOH} \\ \diagdown \\ \text{CH}_3 \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\alpha$ -Амино-изовалериановая кислота	1,6
Фенилаланин	$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{COOH} \\   \\ \text{NH}_2 \end{array}$	$\alpha$ -Амино- $\beta$ -фенилпропионовая кислота	2,2
Глутаминовая кислота	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\   \\ \text{CH}-\text{NH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{CH}_2 \\   \\ \text{COOH} \end{array}$	$\alpha$ -Аминоглутаровая кислота	



В растительных продуктах, составляющих основу питания человека и животных, в недостаточном количестве может быть лизин, метионин и иногда триптофан. Препараты этих аминокислот имеют большое значение в формировании правильного питания человека и в сбалансированности кормов для домашних животных. В пищевой промышленности и кулинарии многих стран в качестве специи используется натриевая соль глутаминовой кислоты, придающая ощущение сытости. Препараты аминокислот используют в медицине, например для парентерального питания больных и для исследовательских работ в качестве реагентов.

Аминокислоты можно получить химическим синтезом, но в этом случае образуется трудно разделяемая рацемическая смесь *L*- и *D*-форм аминокислот. Биологически активными и потому используемыми в питании человека и животных являются *L*-аминокислоты, исключение составляет только метионин. В Советском Союзе освоен метод промышленного получения *D*-, *L*-метионина химическим синтезом.

Аминокислоты можно получить и гидролизом природных белков с последующим выделением аминокислот из гидролизата. Однако запасы белков ограничены, кроме того, при кислотном гидролизе некоторые аминокислоты, например триптофан, разрушаются. В будущем, возможно, будут получать аминокислоты из белков микробного происхождения, химически или ферментативно гидролизуя их.

Аминокислоты можно получить и из соответствующих кетокислот, химически или микробиологически аминируя их. Однако проблема получения *L*-аминокислот путем аминирования до сих пор практически не решена.

Сейчас во всем мире в больших количествах получают глутаминовую кислоту или ее натриевую соль (около 100 000 т в год), *L*-лизин и метионин (по 50 000 т в год). Большую часть этого количества дает микробиологический синтез (за исключением получения метионина). Для биосинтеза используют ауксотрофные мутанты, т. е. бактерии, которые под влиянием мутагенных факторов (облучение, химическое воздействие и др.), утратили способность самостоятельно синтезировать какую-нибудь необходимую для роста и развития аминокислоту, например гомосерин, а с другой стороны, приобрели способность к сверхсинтезу другой аминокислоты. Это значит, что для роста и размножения таких бактерий в среде должны содержаться определенные аминокислоты — гомосерин, треонин или метионин и т. д. Очень часто этим мутантам необходим и биотин. Такие бактерии называют гомосериндефицитными или биотиндефицитными. В то же время эти мутанты обладают способностью в большом количе-

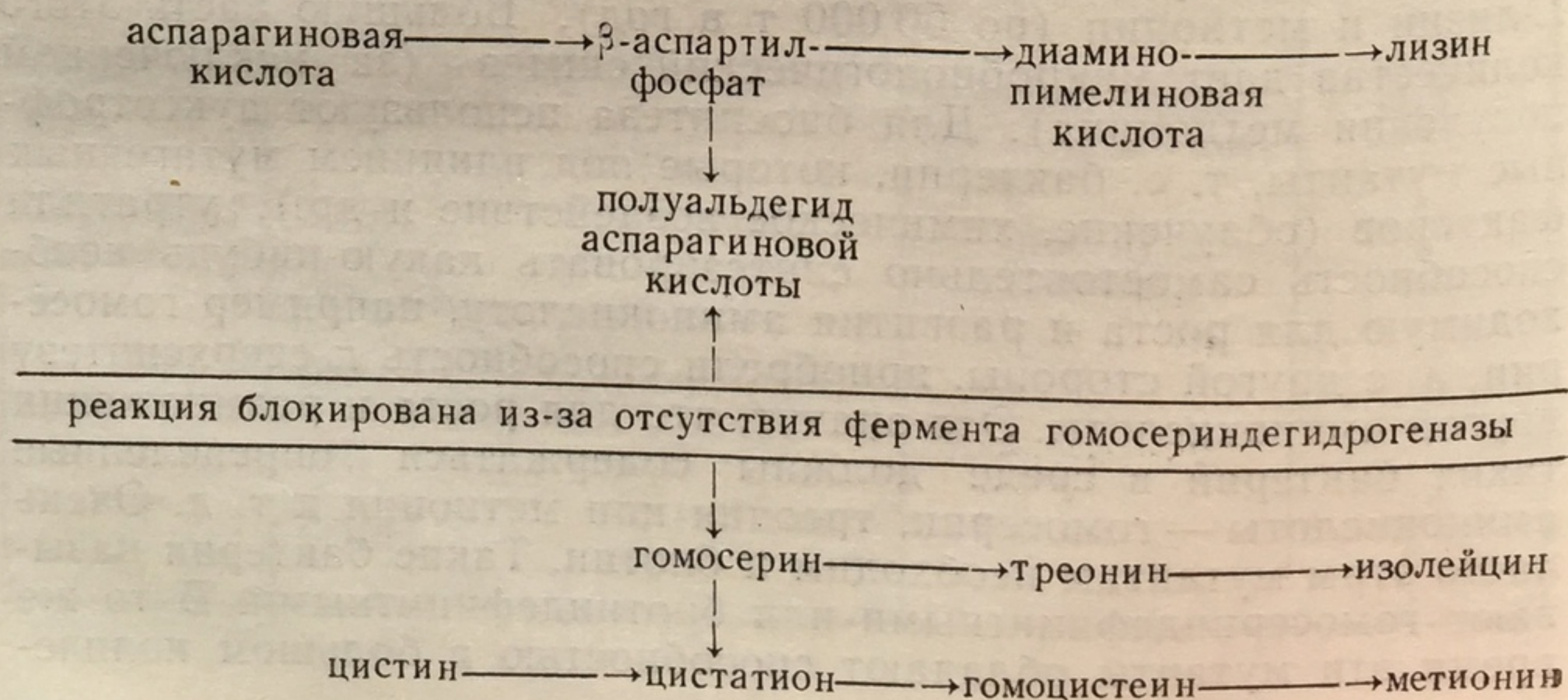


стве синтезировать другую аминокислоту — лизин или глутаминовую кислоту и выделять их в окружающую среду.

Мутагенные факторы могут изменить нормальный биосинтез аминокислот в клетке, воздействуя на генетический аппарат. Если в результате облучения или воздействия химических факторов ДНК не дает информацию для синтеза фермента и в клетке не синтезируется, например фермент гомосериндегидрогеназа, катализирующий превращение полуальдегида аспарагиновой кислоты в гомосерин, то клетка может синтезировать необходимые для своего существования белки только в том случае, если в питательной среде уже содержится готовый гомосерин. Так как аспарагиновая кислота является исходным пунктом биосинтеза не только гомосерина, но и треонина, изолейцина, метионина, а также лизина, то отсутствие упомянутого фермента влияет на биосинтез всех этих аминокислот. Прекращение биосинтеза гомосерина одновременно прекращает биосинтез треонина, изолейцина и метионина, поэтому эти аминокислоты также должны содержаться в среде роста данной культуры. В данных условиях весь ход биосинтеза аминокислот в клетке идет в направлении от аспарагиновой кислоты к лизину.

В результате изучения ауксотрофных мутантов выяснено, что продуценты орнитина являются аргинин- или цитруллиндефицитными; продуценты гомосерина или диаминопимелиновой кислоты — треониндефицитными; продуценты изолейцина — лизиндефицитными; продуценты тирозина — фенилаланиндефицитными. Иногда встречаемые в природе бактерии способны в процессе роста накопить в среде до 2—5 г/л свободных аминокислот, но ауксотрофные мутанты продуцируют их в значительно больших количествах — 20—100 г/л.

Схема образования аминокислот семейства аспарагиновой кислоты приведена ниже.





## ЛИЗИН

Еще 50 лет назад ученые Осборн и Мендель доказали, что в белке пшеницы мало лизина. В настоящее время установлено, что лизин в организме является не только структурным элементом белка, но и выполняет ряд важных биохимических функций — является предшественником карнитина и оксилизина, способствует транспорту кальция и стронция в клетки и др. В настоящее время во многих странах препарат лизина добавляют к хлебу для повышения его биологической ценности, а также для улучшения внешнего вида. Доказано, что лизин улучшает аппетит, способствует секреции пищеварительных ферментов, предотвращает кариес зубов у детей.

Лизин является самой дефицитной в кормах животных незаменимой аминокислотой. Установлено, что добавка лизина в количестве 0,1—0,4% к кормам значительно увеличивает продуктивность домашних животных.

Для биосинтеза лизина используют гомосериндефицитные мутанты ауксотрофных бактерий родов *Brevibacterium*, *Micrococcus*, *Corynebacterium* и др.

Активный продуцент лизина *Brevibacterium* sp. 22 получен в Институте биохимии им. А. Баха АН СССР под руководством В. Букина.

Клетки этой культуры представляют собой неподвижные грамположительные палочки длиной 1,2—2,5 мкм, но иногда могут иметь овальную или круглую форму. На Ливанском экспериментальном биохимическом заводе (Латвийская ССР) в результате селекции получена культура *Brevibacterium* sp. 22 L с выраженной желто-оранжевой пигментацией. В Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР электронно-микроскопически было доказано, что клетки *Brevibacterium* sp. 22 L размножаются делением с образованием поперечной стенки (см. приложения 14, 15).

Клетки имеют максимальную длину в логарифмической фазе роста. У быстрорастущих клеток хорошо выражен рибосомальный белоксинтезирующий аппарат, а у медленно растущих, но интенсивно синтезирующих лизин — мембранная система. У клеток, интенсивно синтезирующих лизин, большую активность проявляют и ферменты цикла Кребса, многие из которых связаны с мембранами.

Продуценты лизина культивируются на средах, содержащих углеводы или уксусную кислоту, источники азота и кислород. В клетках бактерий лизин синтезируется из пировиноградной, аспарагиновой и янтарной кислот по схеме, показанной на рис. 54.







Химизм образования молекулы лизина показан на рис. 55. При получении лизина необходимо исключить нежелательные побочные процессы. Так, при недостаточной аэрации может идти образование аланина или молочной кислоты вместо синтеза лизина. Очень важным фактором является концентрация дефицитных аминокислот — гомосерина, метионина и треонина в

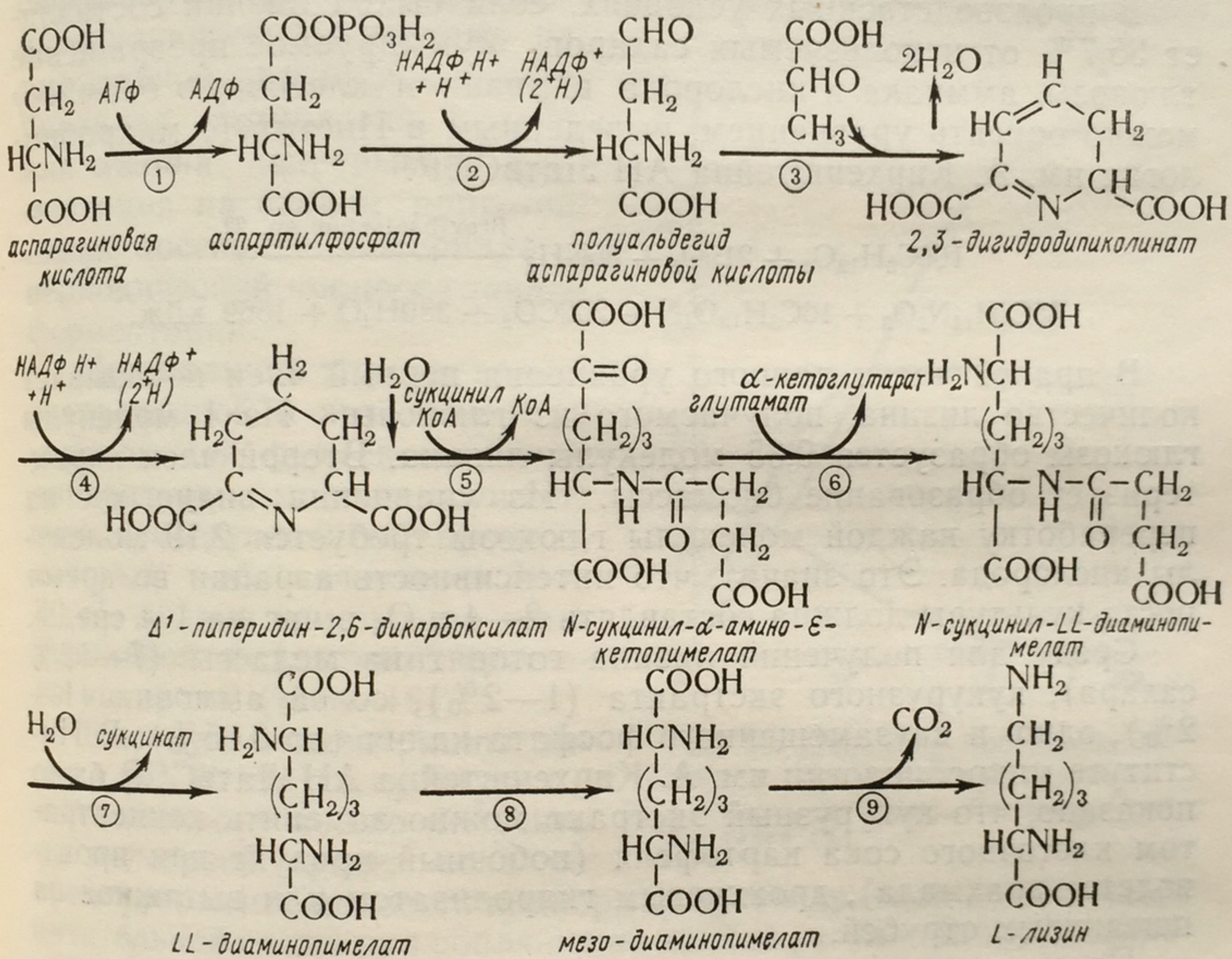


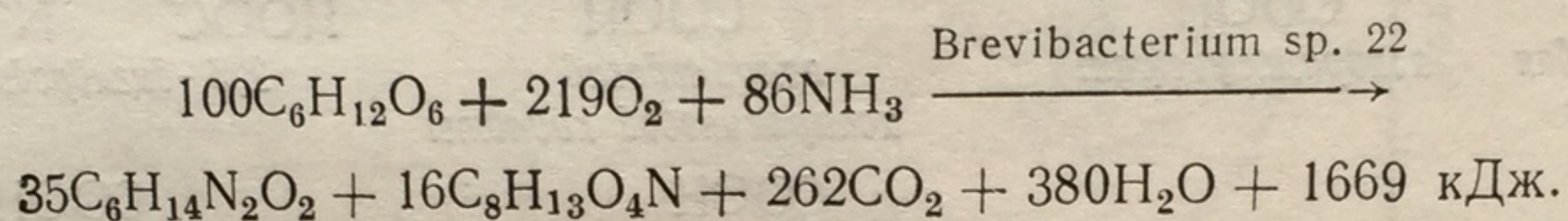
Рис. 55. Химизм биосинтеза лизина

среде. Для нормального роста и биосинтеза лизина культурой *Brevibacterium* sp. 22 оптимальной считается концентрация треонина в 800 мг, метионина — 200 мг на литр питательной среды. Кроме того, для развития культуры необходим тиамин в концентрации 200 мкг на 1 л среды. Важным регулятором процесса является биотин. Одна и та же культура *Brevibacterium* sp. 22 при концентрации биотина в среде, равной 1—4 мкг/л, продуцирует глутаминовую кислоту, а при концентрации 15—20 мкг/л — лизин. Считают, что биотин изменяет проницаемость клеточной оболочки. При концентрации биотина 2,5 мг/л стимулируется также образование молочной кислоты.



Важную роль играет треонин, являясь обязательным фактором роста на начальном этапе ферментации. Однако концентрация его не должна быть большой, так как на дальнейших этапах ферментации (при синтезе лизина) он может действовать как ингибитор фермента аспартаткиназы. Присутствие лизина усиливает ингибирующие свойства треонина.

В производственных условиях, если выход лизина составляет 35,7% от используемых сахаров, суммируемое превращение глюкозы, аммиака и кислорода в лизин и клеточную биомассу можно описать уравнением, выведенным в Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР.



В правой части данного уравнения первый член показывает количество лизина, получаемого из глюкозы. Из 1 молекулы глюкозы образуется 0,35 молекулы лизина. Второй член характеризует образование биомассы. Из уравнения видно, что на переработку каждой молекулы глюкозы требуется 2,19 молекулы кислорода. Это значит, что интенсивность аэрации во время роста культуры должна составлять 2—4 г  $\text{O}_2$  в час на 1 л среды.

Среду для получения лизина готовят из мелассы (7—12% сахара), кукурузного экстракта (1—2%), солей аммония (1—2%), одно- и двузамещенного фосфата калия (по 0,05%). В Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР было показано, что кукурузный экстракт можно заменить концентратом клеточного сока картофеля (побочный продукт при производстве крахмала), дрожжевым гидролизатом или вытяжкой из пшеничных отрубей.

После стерилизации такую среду используют для выращивания посевного материала, а также и для главной ферментации.

Сначала культуру размножают на качалке в колбах, затем в ферментаторах объемом 100 и 3000 л. Количество посевного материала 5—10%, оптимальная температура 30—33°C, pH 7,4. Длительность ферментации посевного материала на каждой стадии около 24 ч.

Главная ферментация идет 50—70 ч при аналогичных режимах. Концентрация лизина в растворе достигает 20—40 г/л, а выход по сахару — 25—35%. Концентрация клеточной биомассы 10—15 г/л (по сухой массе).

Динамика образования лизина, биомассы и ассимиляции сахаров показана на рис. 56.

В Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР разработаны основы непрерывной ферментации лизина



в меласно-кукурузной среде при помощи культуры *Brevibacterium* 22 и 22 L. При гомогенной ферментации по методу хемостата выявлено, что равновесное состояние системы устанавливается при скорости потока  $0,05 \leq D \leq 0,20 \text{ ч}^{-1}$ , при этом концентрация лизина составляет 6—8 г/л, содержание биомассы около 8 г/л. Проточная культура обладает повышенной лизин-синтезирующей способностью (на 20—25% выше по сравнению с периодической), поэтому рациональной является комбинированная технология получения лизина: непрерывная ферментация на стадии приготовления посевного материала и периодический процесс главной ферментации.

При наличии хорошо герметизированной и автоматически управляемой ферментационной аппаратуры можно осуществить трехступенчатый процесс, который обеспечивает 20—30 г/л лизина при выходе культуральной жидкости из третьего аппарата (табл. 16).

Высокую концентрацию лизина (до 60 г/л) в культуральной жидкости можно получить на меласной среде, если во время ферментации вести подкормку путем дробной подачи части питательной среды при соблюдении точной регуляции культивиро-

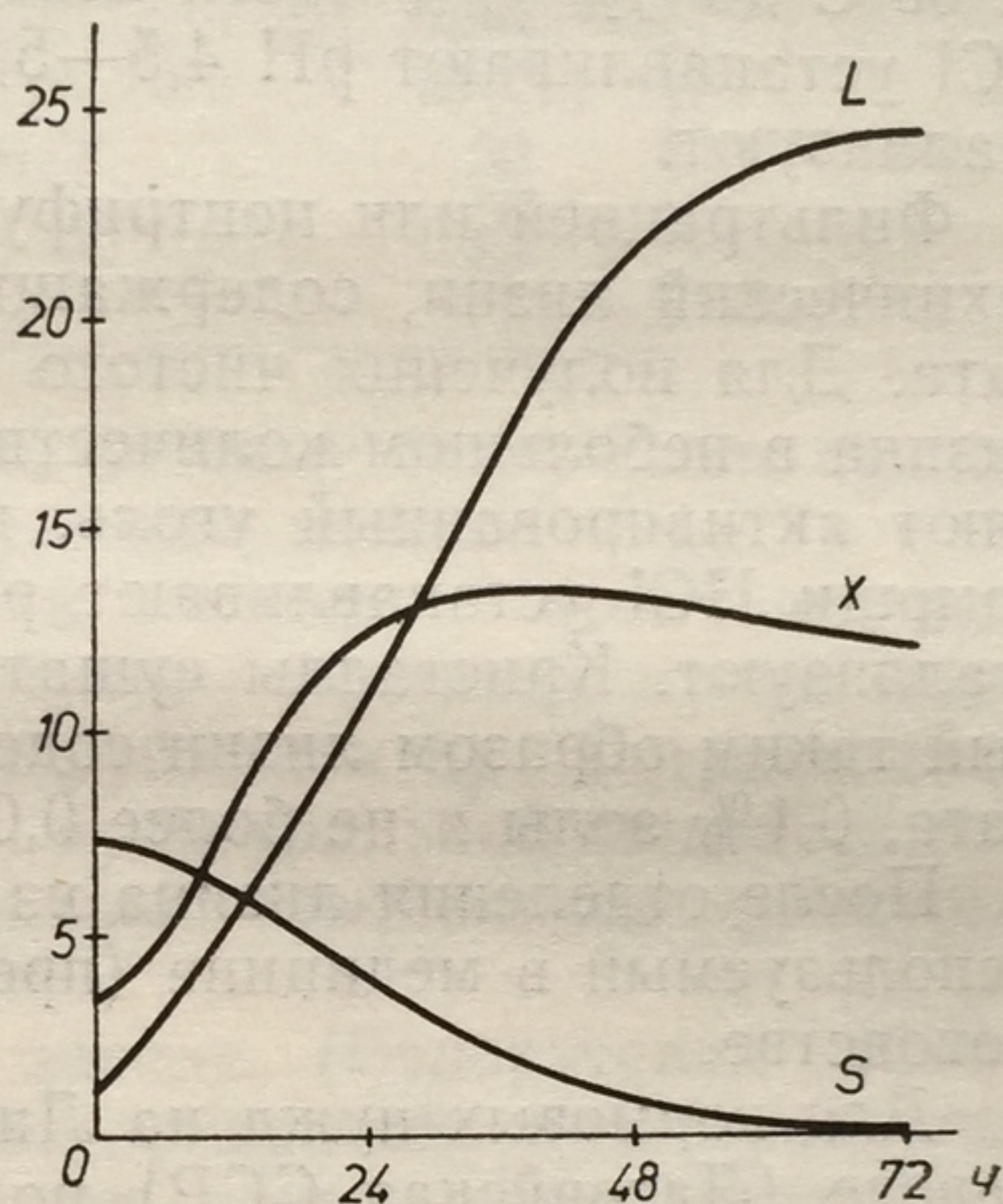


Рис. 56. Динамика биосинтеза лизина и образования биомассы:  
X — биомасса (г/л), L — лизин (г/л),  
S — сахар (%)

Таблица 16. Показатели непрерывного процесса биосинтеза лизина в трехступенчатой системе

Показатели	Ферментаторы		
	I	II	III
Содержание биомассы, г/л	$9,0 \pm 0,7$	$15,4 \pm 0,7$	$13,7 \pm 1,1$
Концентрация L-лизина монохлорида, г/л	$5,4 \pm 0,5$	$15,1 \pm 1,1$	$24,7 \pm 2,3$
Концентрация остаточных сахаров, %	$5,6 \pm 0,5$	$3,0 \pm 0,3$	$1,1 \pm 0,3$
pH среды	$7,4 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,1$	$7,1 \pm 0,1$
Коэффициент разбавления, $\text{ч}^{-1}$	0,15	0,10	0,08
Интенсивность аэрации, г $\text{O}_2/(\text{л} \cdot \text{ч})$	4	2	2



вания. Мелассу можно заменить на сахарозу, диффузионный сок сахарной свеклы, глюкозу или гидролизаты крахмала, древесины, торфа, а также на уксусную кислоту.

Для получения кристаллического лизина клеточную массу центрифугируют, а культуральную жидкость пропускают через катионит КУ-2 или КВ-4-Р-2. Лизин элюируют 2,0—3,5%-ным раствором  $\text{NH}_4\text{OH}$ , элюат упаривают в вакууме при температуре  $60^\circ\text{C}$  до  $1/20$ — $1/30$  части исходного объема. Затем при помощи  $\text{HCl}$  устанавливают рН 4,5—5,0, охлаждают до  $14$ — $18^\circ\text{C}$  и кристаллизуют.

Фильтрацией или центрифугированием кристаллов получают технический лизин, содержащий 94—96% лизина монохлоргидрата. Для получения чистого лизина кристаллы технического лизина в небольшом количестве воды нагревают до  $70^\circ\text{C}$ , добавляют активированный уголь, перемешивают и фильтруют. При помощи  $\text{HCl}$  устанавливают рН 4,9, раствор упаривают и кристаллизуют. Кристаллы сушат при температуре  $60^\circ\text{C}$ . Полученный таким образом лизин содержит 99,9% лизина монохлоргидрата, 0,1% золы и не более 0,001% тяжелых металлов.

После отделения лизина из фильтрата еще выделяют бетаин, используемый в медицине (препарат асидин), а также в животноводстве.

Для кормовых нужд на Ливанском опытном биохимическом заводе (Латвийская ССР) получают концентрат лизина. В соответствии с методом, разработанным в Институте биохимии им. А. Баха АН СССР совместно с Институтом микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР, после ферментации культуральную жидкость подкисляют до рН 5,0—6,0, добавляют для стабилизации 0,15%-ный раствор бисульфита натрия и выпаривают в вакуум-аппаратах до 40—50%-ного содержания сухих веществ. Полученный жидкий концентрат лизина (ЖКЛ) можно использовать для обогащения кормов. При высушивании жидкого концентрата лизина в распылительных сушилках (температура поступающего воздуха  $300^\circ\text{C}$ , выходящего —  $90$ — $100^\circ\text{C}$ ) до влажности 5—6% получают сухой кормовой концентрат лизина (ККЛ).

Термическое обезвоживание продуктов ферментации лизина может вызвать связывание лизина с редуцирующими сахарами среды. При соединении глюкозы или других соединений, содержащих карбонильные группы, с  $\epsilon$ -аминогруппой лизина, он переходит в форму, не усвояемую организмом. Поэтому надо следить, чтобы в процессе ферментации были полностью использованы все редуцирующие вещества, рН раствора лизина перед высушиванием и упариванием должен быть кислым, необходимо



также стабилизировать среду сульфитом натрия или гексаметафосфатом натрия.

Состав кормового концентрата лизина (ККЛ) следующий:

Сухие вещества, %	94—95
Лизин монохлоргидрат, %	10—20
Другие аминокислоты, %	13—14
Зольные вещества, %	20—25
Рибофлавин, мкг/г	130
Бетаин, %	10—13
Пантотеновая кислота, мкг/г	50
Фолиевая кислота, мкг/г	20
Никотинамид, мкг/г	65

Сухой ККЛ очень гигроскопичен, поэтому сразу после сушки его упаковывают в полиэтилен-бумажные мешки.

Менее гигроскопичный и сыпучий концентрат получают, высушивая лизин вместе с наполнителями — костяной мукой, кормовыми дрожжами, пшеничными отрубями и др. Гигроскопичность снижается, если оставшиеся в культуральной жидкости сахара и органические кислоты усваивают специальные культуры дрожжей в процессе дображивания.

На Обольском биохимическом заводе (Белорусская ССР) ККЛ получают из более концентрированной культуральной жидкости, смешивая ее с отрубями до образования формуемой массы и после получения гранул высушивают их методом конвективной сушки на лентах при температуре 70—80°C. Размалыванием сухих гранул получают сыпучий негигроскопичный порошок, содержащий 7—10% лизина.

Биологическая и зоотехническая проверки показали, что по биологическим свойствам концентрат лизина ценнее, чем кристаллический лизин.

Производство ККЛ почти в 2 раза дешевле производства кристаллического лизина, кроме того, легче очищаются сточные воды.

Учитывая содержание ряда биологически активных веществ в концентрате лизина, а также его стабилизирующие свойства, выгодно на основе жидкого концентрата лизина и сухого концентрата лизина с наполнителем готовить витаминно-аминокислотные премиксы. Сухой премикс получают на основе ККЛ с отрубями путем добавления предусмотренного соответствующей рецептурой количества витаминов и других биологически активных веществ. При этом учитывается не только собственно лизин ККЛ, но также бетаин и рибофлавин.

Лизин можно получать, работая по двухступенчатому методу. На первой ступени при помощи микробиологического синте-



за (аналогичного биосинтезу лизина) или химического синтеза (из толуола, керосина и др.) получают  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -диаминопимелиновую кислоту. На второй ступени проводят ферментативное декарбоксилирование  $\alpha$ ,  $\epsilon$ -диаминопимелиновой кислоты.

### ТРИПТОФАН

Триптофан используют в медицине, а также как реагент в биохимических исследованиях; в небольших количествах он требуется для нужд животноводства. Триптофан получают из антраниловой кислоты, используя особые штаммы дрожжей *Candida* или *Hansenella*.

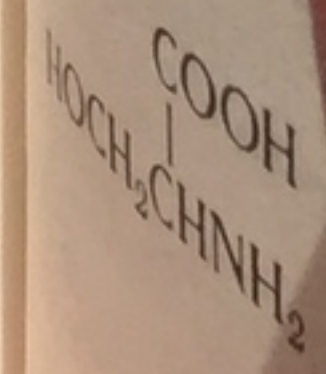
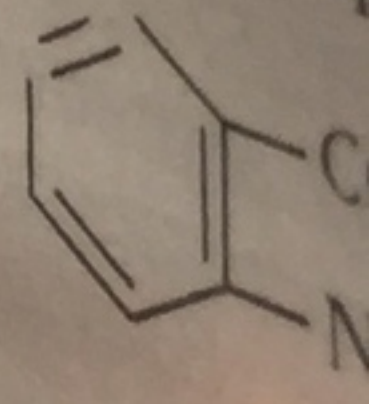
Антраниловая кислота ядовита. Синтезируя триптофан, упомянутые дрожжи освобождают клетки от этого вредного соединения, превращая его в важную для биосинтеза белков аминокислоту.

Для размножения дрожжей можно использовать мелассу, диффузионный сок сахарной свеклы, сахарозу или другие среды, содержащие усваиваемые источники углерода.

В Институте микробиологии АН СССР совместно с Институтом микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР разработана технология получения L-триптофана при помощи дрожжей *Candida utilis* 295. Клетки *Candida utilis* 295-t способны трансформировать антраниловую кислоту в течение 3—4 циклов возобновления среды. Можно также применять двухступенчатый процесс ферментации дрожжей *Candida utilis* 295-t. При этом на первой ступени в меласной среде по гомогенному турбидостатному методу получают активную биомассу, а на второй — при дробной подаче антраниловой кислоты осуществляется ее микробиологическая трансформация в триптофан. На первом этапе важно получить высокую концентрацию биомассы (до 120 г/л), второй этап — периодический процесс. Получают до 6 г/л триптофана.

Активный штамм дрожжей — продуцент триптофана — сохраняют на скошенном сусло-агаре и пересевают один раз в месяц. После посева выдерживают 48 ч в термостате при 28—30°C, затем сохраняют в холодильнике. Далее проводят подготовку посевного материала для двухступенчатой ферментации.

Состав питательной среды для колб следующий (в г/л): меласса 104; мочевины 5;  $K_2HPO_4$  0,1;  $MgSO_4$  0,05;  $CaCl_2$  0,1; pH 7,5—8. Колбы выдерживают на качалке 24 ч при 28—30°C. После 24 ч выращивания содержимое колб первой стадии в стерильных условиях переносят в качалочные колбы емкостью 750 мл, содержащие по 100 мл питательной среды указанного выше состава.





После 24 ч выращивания на качалке биомасса дрожжей второй стадии используется для дальнейшего накопления дрожжевой массы в ферментаторе.

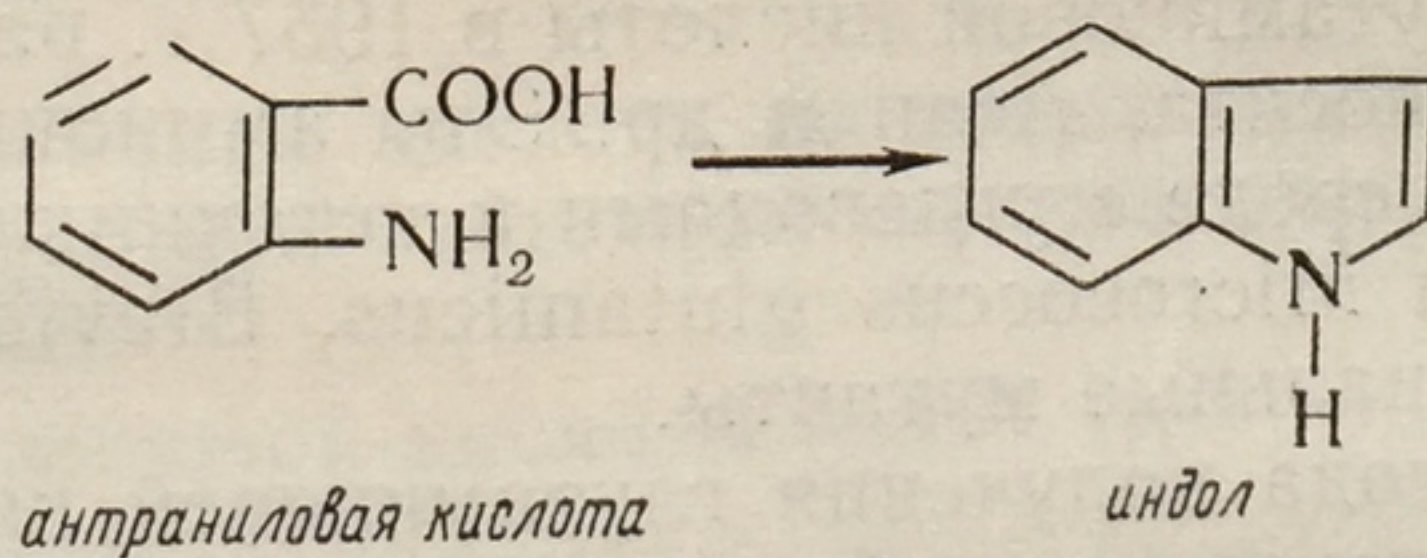
Процесс ферментации в ферментаторах проводят так. Производственную питательную среду, содержащую (в г/л) мелассы 62,3; мочевины 5;  $K_2HPO_4$  0,1;  $CaCl_2$  0,1;  $MgSO_4$  0,05, стерилизуют 30 мин при 0,1 МПа (1 кгс/см<sup>2</sup>), pH среды 7,5—8. После охлаждения до 30°C туда в стерильных условиях переносят посевной материал, который содержит не менее 3—5 г/л сухой биомассы. В ферментаторе в течение 24 ч дрожжи культивируют при аэрации не менее 7 г  $O_2$ /(л·ч).

В качестве пеногасителя можно использовать подсолнечное масло, кашалотовый жир или кремнийорганическое соединение.

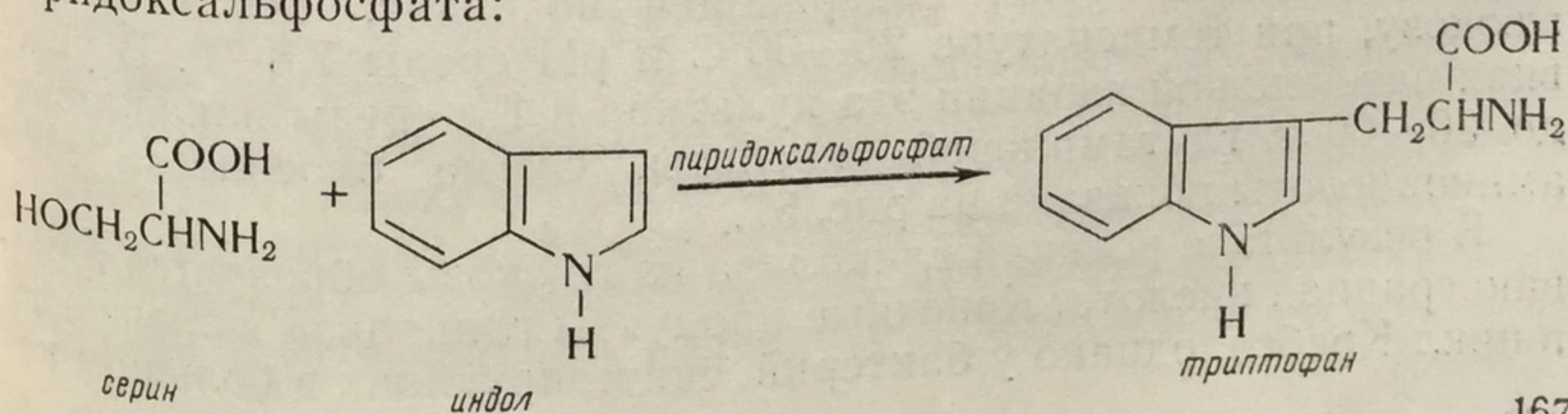
Через 24 ч в культуральную жидкость добавляют антраниловую кислоту в виде 5%-ного спиртового раствора и мочевины в виде 50%-ного раствора. После внесения антраниловой кислоты начинается вторая стадия ферментации — биосинтез L-триптофана. Уровень аэрации снижается до 3—4 г  $O_2$ /(л·ч). После добавления в среду антраниловой кислоты и мочевины через 4 ч добавляют мелассу в виде 25%-ного раствора. На дальнейшем этапе ферментации добавки проводят в следующем порядке: мелассный раствор добавляют через каждые 12 ч, антраниловую кислоту одновременно с источником азота вносят через каждые 6 ч.

Через 144 ч ферментацию прекращают.

Механизм трансформации антраниловой кислоты в триптофан может быть представлен следующим образом. Вначале из антраниловой кислоты ферментативно образуется индол



По мнению М. М. Шемякина и А. Е. Браунштейна, триптофан образуется при конденсации серина и индола в присутствии пиридоксальфосфата:





После осаждения биомассы триптофан из культуральной жидкости выделяют при помощи ионообменных смол и затем элюируют раствором аммиака в изопропиловом спирте.

В Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР разработан метод получения кормового концентрата триптофана. В его состав входит также дрожжевая биомасса.

### ГЛУТАМИНОВАЯ КИСЛОТА И ГЛУТАМАТ НАТРИЯ

Производство глутаминовой кислоты и особенно ее натриевой соли, т. е. глутамата натрия, достигло больших размеров. Глутамат натрия из-за его специфического вкуса добавляют к пищевым концентратам, супам, соусам, консервам и др. Основы

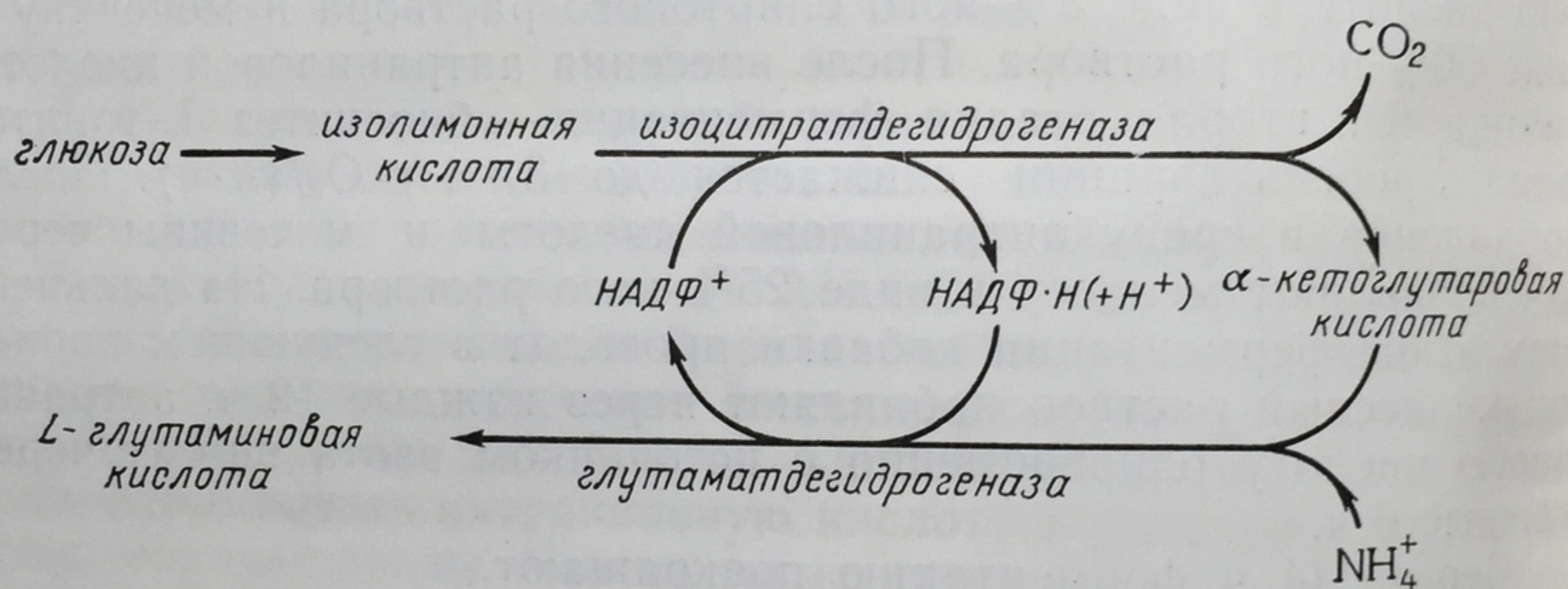


Рис. 57. Схема биосинтеза глутаминовой кислоты

производства глутаминовой кислоты в 1957 г. разработали японские ученые Киносита, Асаи и др. Эту аминокислоту во время ферментации на среде с углеводами и источниками азота накапливает культура *Micrococcus glutamicus*, *Brevibacterium flavum* и другие бактериальные мутанты.

В основе метода получения глутаминовой кислоты, разработанного в Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР, лежит использование деятельности мелких, грамположительных, круглых или овальных бактерий *Micrococcus glutamicus* 541 Р в среде, содержащей мочевины, сахарозу или глюкозу, при температуре 28—30°C и рН среды 7,8—8. В условиях интенсивной аэрации эта культура в 1 л среды накапливает до 30—60 г глутаминовой кислоты. Схема биосинтеза этой аминокислоты показана на рис. 57.

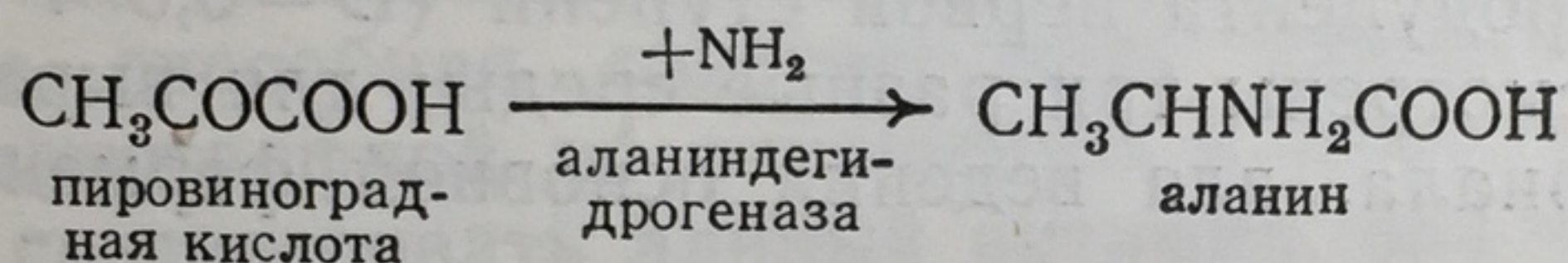
В результате реакций гликолиза из глюкозы образуется пирувоградная кислота. Конечные продукты гликолиза включаются в цикл Кребса, однако у бактерий, синтезирующих в большом ко-



личестве свободную глутаминовую кислоту, отсутствует  $\alpha$ -кетоглутаратдегидрогеназа. Поэтому они не могут нормально проводить все реакции цикла Кребса и процесс останавливается на стадии  $\alpha$ -кетоглутаровой кислоты, не образуя далее янтарную кислоту.

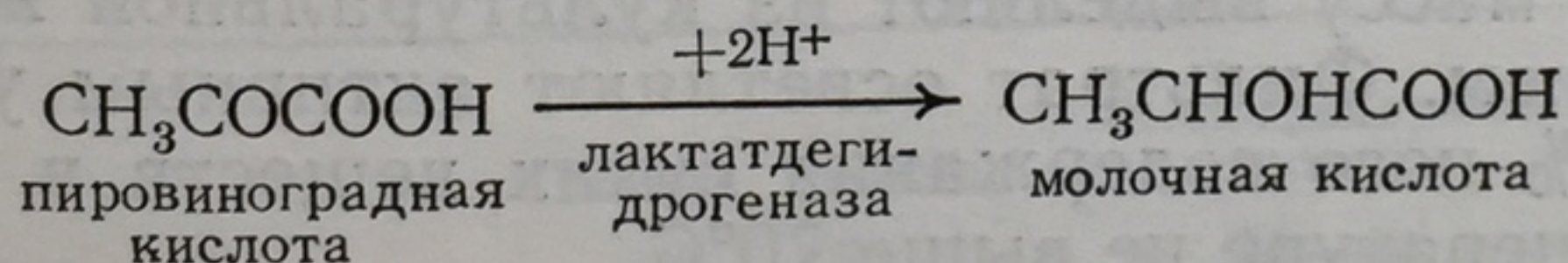
Для сохранения образовавшейся глутаминовой кислоты в клетках бактерий не должна присутствовать оксидаза глутаминовой кислоты.

Небольшие отклонения от оптимального режима во время ферментации глутаминовой кислоты могут вызвать образование других веществ, что связано с потерями углеводов. В условиях недостаточной аэрации активируется аланиндегидрогеназа, катализирующая образование аланина из пировиноградной кислоты.



Аланин образуется также при переаминировании глутаминовой кислоты в присутствии трансаминазы (реакции, открытые А. Брунштейном и В. Крицман).

Нерациональные потери углеводов во время ферментации могут иметь место и в результате деятельности фермента лактатдегидрогеназы, превращающего пировиноградную кислоту в молочную:



Аланин и молочная кислота во время ферментации образуются не только при недостаточном аэрировании, но и при избытке биотина в среде.

Синтез глутаминовой кислоты имеет место при концентрации биотина 2—3 мкг/л.

Для микробиологического получения глутаминовой кислоты и глутамата натрия культуру размножают в лаборатории сначала в пробирках, затем в колбах на качалке. Питательная среда содержит 5% сахарозы, 1% мочевины, 1,5% мелассы и по 0,1% сульфата магния, одно- и двухзамещенного фосфата калия; рН 6,8—7,5, температура 30°C. Инкубация на каждой стадии длится 24 ч. Инокулят готовят в аэробных условиях на среде такого же состава в ферментаторах объемом 200 л и 5 м³ до получения 6—8 г/л сухой биомассы. Инокулят в количестве 5—6% переносят в главный ферментатор объемом 50 м³, 70% об-



щего объема которого занимает питательная среда. Состав среды следующий: 8,5—10% сахарозы, 1,2% мелассы, 0,5% мочевины, по 0,1% одно- и двухзамещенного фосфата калия, по 0,01% сульфата марганца и сульфата цинка. Интенсивность аэрации 40—45 мг  $O_2$ /мин, рН 7,8—8, температура 30°C. Ферментация длится 2 сут. За это время в среде накапливается глутаминовой кислоты до 50 г/л.

Интересные результаты по получению глутаминовой кислоты непрерывным методом получены японскими учеными. Так, культура *Microbacterium ammoniaphilum* в трехступенчатом непрерывном процессе на среде, содержащей глюкозу, обеспечила синтез глутаминовой кислоты при выходе из третьей ступени на уровне 40 г/л. При этом  $D$  в отдельных ферментаторах была от 0,13 до 0,05 ч<sup>-1</sup>. На мелассной среде достигнута высокая скорость роста продуцента первой ступени ( $D=0,3$  ч<sup>-1</sup>). В данном случае предусмотрены три разные среды: для выращивания посевого материала, для ведения основной ферментации и для подкормки.

Если в синтетической среде лимитация роста культуры достигается при помощи недостатка биотина, то на мелассной — при помощи пенициллина, который непрерывно поступает во второй ферментатор (3 ед./мл среды).

Биотин и пенициллин влияют на состав липидов в цитоплазматической мембране, что в свою очередь изменяет ее проницаемость.

Клеточную массу выделяют из культуральной жидкости центрифугированием. Фильтрат осветляют активным углем, сгущают до 40—50%-ного содержания сухих веществ в вакуум-аппаратах при температуре не выше 70°C.

Глутаминовую кислоту кристаллизуют при температуре 15°C и рН 3,2 (устанавливают с помощью HCl) до тех пор, пока в маточном растворе остается не более 20—30 г глутаминовой кислоты.

Кристаллы, содержащие 80% глутаминовой кислоты, растворяют в горячей воде в соотношении 1 : 5, обрабатывают углем и фильтруют. Затем кристаллизуют второй раз и получают кристаллы, содержащие 99% глутаминовой кислоты. Эту кислоту можно использовать как медикамент.

Для получения глутамата натрия глутаминовую кислоту нейтрализуют до рН 6,8 45—50%-ным раствором NaOH и полученные кристаллы сушат при температуре 60—65°C. Содержание чистого вещества в этом случае составляет 98%.

Многократная перекристаллизация вещества приводит к большим потерям.



## Глава IX

# ПОЛУЧЕНИЕ ВИТАМИНОВ, АНТИБИОТИКОВ И ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

### ПОЛУЧЕНИЕ ВИТАМИНОВ

Микроорганизмы содержат много витаминов, которые чаще всего входят в состав ферментов. Состав и количество витаминов в биомассе зависят от биологических свойств данной культуры микроорганизмов и условий культивирования. Некоторые витамины микроорганизмы синтезируют, другие напротив усваивают в готовом виде из окружающей среды. Культура, способная синтезировать какой-либо витамин, называется аутотрофной по отношению к нему, если культура не способна синтезировать данный витамин, она является аутогетеротрофной.

### Витамины группы В

Сравнительно богаты витаминами группы В дрожжи (хлебопекарные, пивные, кормовые). Они содержат следующие витамины (в мкг/г в пересчете на сухую массу):

	Пивные дрожжи	Хлебопекарные дрожжи	Кормовые дрожжи
Рибофлавин ( $B_2$ )	25—45	21—80	45—68
Тиамин ( $B_1$ )	10—360	29—90	15—18
Биотин	0,07	0,5—18	1,6—3,0
Инозит	280	3500	400—5000
Фолиевая кислота	4—21	19—35	3,4—21,5
Парааминобензойная кислота	9—59	8—95	17—62
Пантотеновая кислота	42	118—198	30—160
Пиридоксин	30—75	25—50	19—30
Никотиновая кислота	91—126	280—320	440—610

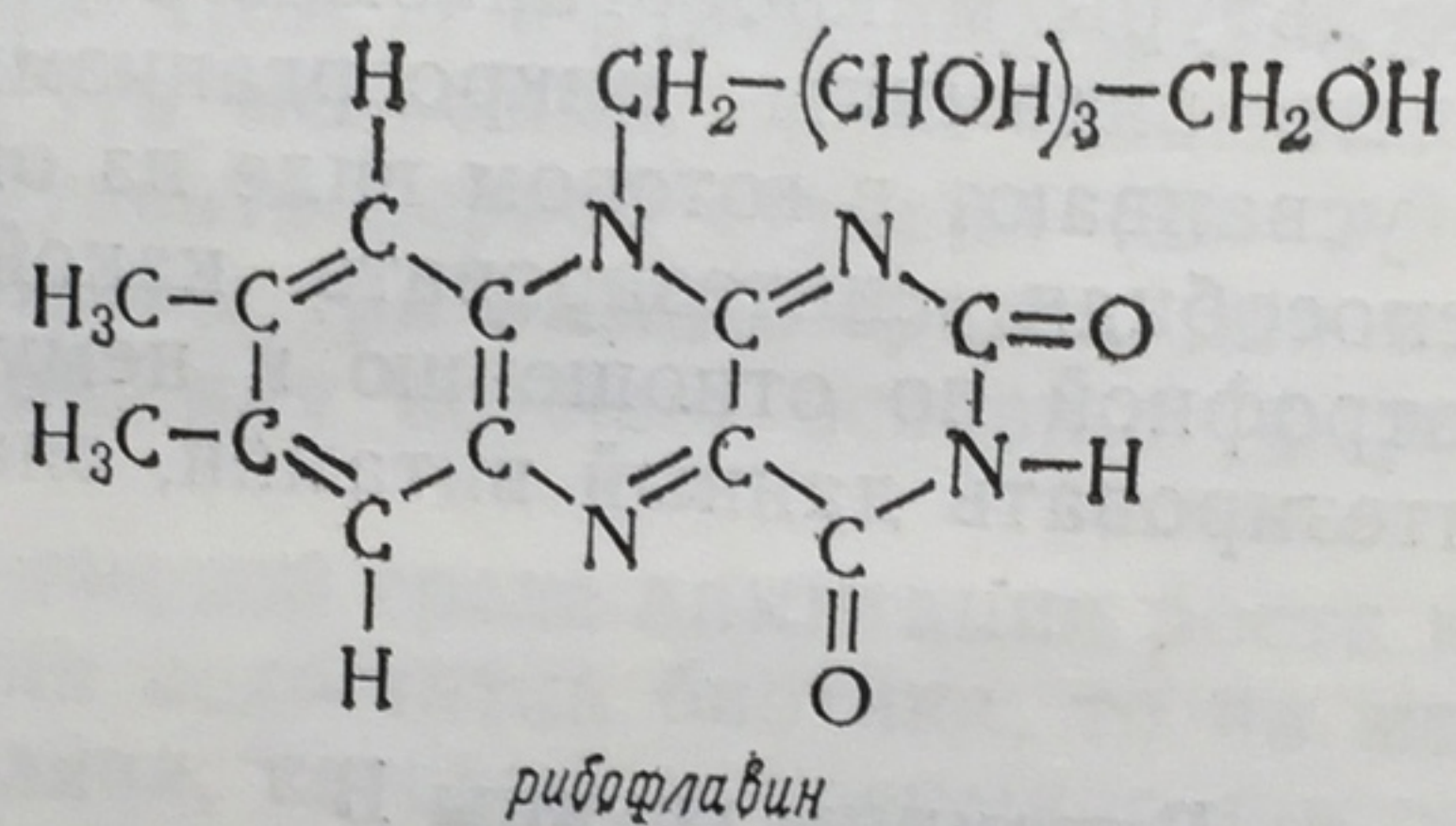
Изменяя условия среды, содержание отдельных витаминов можно увеличить. Так, количество рибофлавина зависит от интенсивности аэрации и содержания железа в среде.

Количество витаминов в клетках, а также их выделение из последних можно изменить при помощи микроэлементов. На-



пример, небольшие добавки марганца способствуют накоплению инозита в клетках. Так, повышенные дозы кобальта (100—500 мкг хлорида кобальта на 100 г) увеличивают содержание пиридоксина (витамин В<sub>6</sub>) в культуральной жидкости.

**Рибофлавин.** Для получения препарата витамина В<sub>2</sub> используют культуру дрожжей *Candida guilliermondia*, бактерии *Clostridium acetobutylicum*, даже продуцент лизина *Brevibacterium* и др. Однако наибольшую продуктивность в биосинтезе рибофлавина имеет дрожжеподобная культура *Eremothesium ashbyii*, дающая до 6000 мкг рибофлавина на 1 г сухого вещества питательной среды.



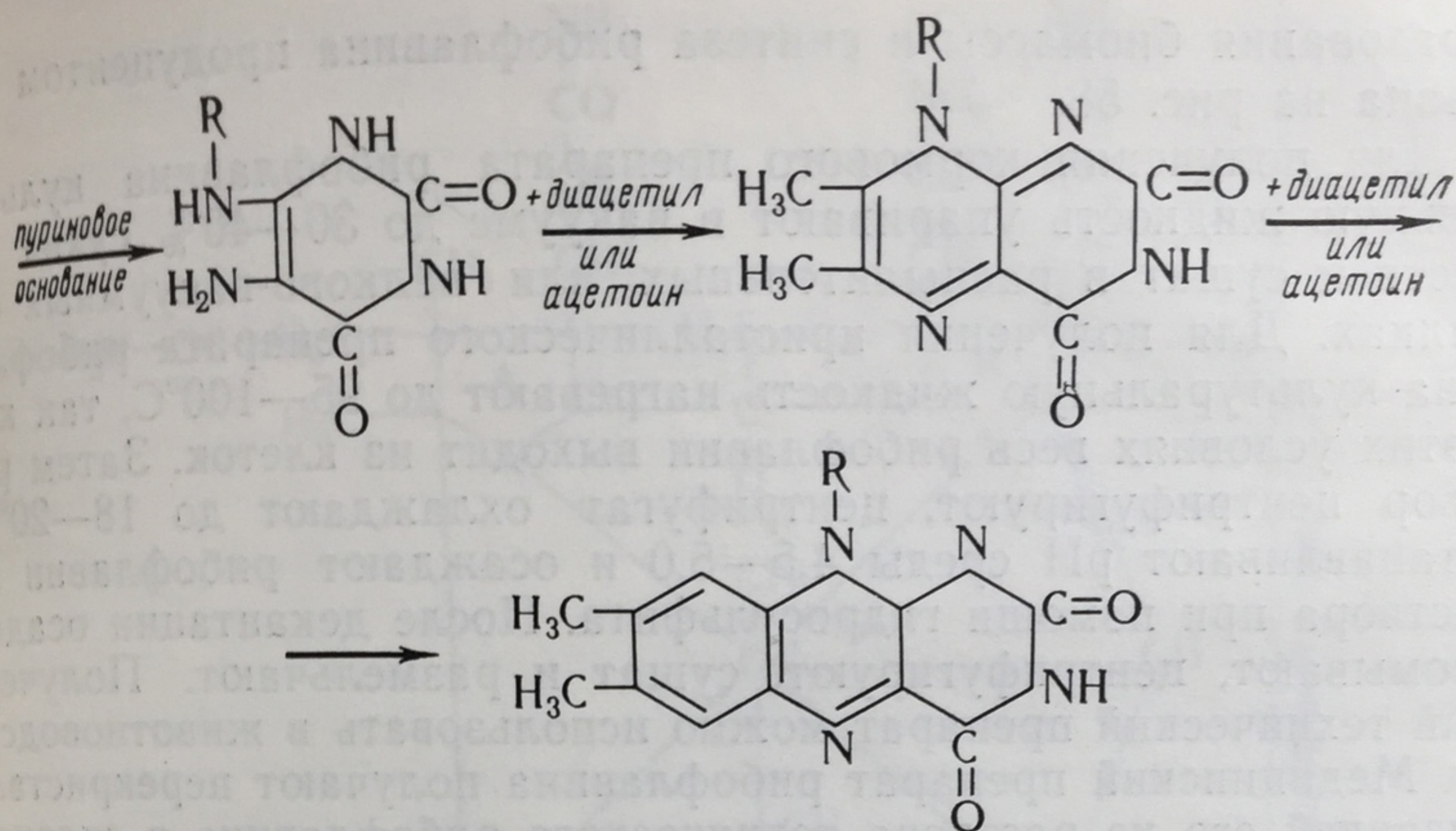
Рибофлавин накапливается в клетках микроорганизмов либо в виде флавинадениннуклеотида, либо в свободном виде. В последнем случае он представляет собой желтые кристаллы, находящиеся в вакуолях. Максимального количества биомассы культура *Eremothesium ashbyii* достигает на второй день культивирования. В это время наблюдается интенсивное спорообразование и синтез рибофлавина.

При старении культуры, особенно через 4—5 сут культивирования, клетки начинают автолизироваться и рибофлавин переходит в среду.

Биосинтез рибофлавина полностью еще не выяснен. Считают, что кольца В и С в молекуле рибофлавина образуются так же, как и пуриновые основания, и накопление рибофлавина в клетках и окружающей среде происходит в результате чрезмерно активного синтеза пуринов. Предшественником рибофлавина, думается, мог бы быть диаминоурацил. Кроме того, из продукта гликолиза — пировиноградной кислоты — может образоваться ацетоин или диацетил, которые, возможно, участвуют в образовании кольца А молекулы рибофлавина.

В процессе постепенного соединения ацетоина или диацетила с производными диаминоурацила может образоваться молекула рибофлавина:





В этом уравнении R — остаток рибозы.

Микроорганизм *Eremothecium ashbuii* развивается и синтезирует рибофлавин на синтетических средах с уменьшенным содержанием углеводов (0,25—1,5%) и повышенным количеством пептона (1—5%), в присутствии витаминов — тиамина, биотина и инозита, а также аминокислот — лейцина, аргинина, метионина, гистидина и тирозина.

Биосинтез рибофлавина стимулируют ацетат аммония и ненасыщенные жирные кислоты, а замедляет железо, поэтому питательную среду предварительно обрабатывают для уменьшения содержания железа до 5—10 мкг на 1 л.

В производственных условиях питательную среду готовят из 1—3% мелассы, гидроля или глюкозы, 3—8% кукурузного экстракта или дрожжевого автолизата, добавляя N, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K, Mg, Zn. Процесс ведут по методу глубинной ферментации при интенсивности аэрации 1,5—2,0 м<sup>3</sup>/мин воздуха на каждый кубический метр культуральной жидкости и температуре 29—30°C. Ферментация длится до стадии лизиса мицелия и образования спор. Динамика

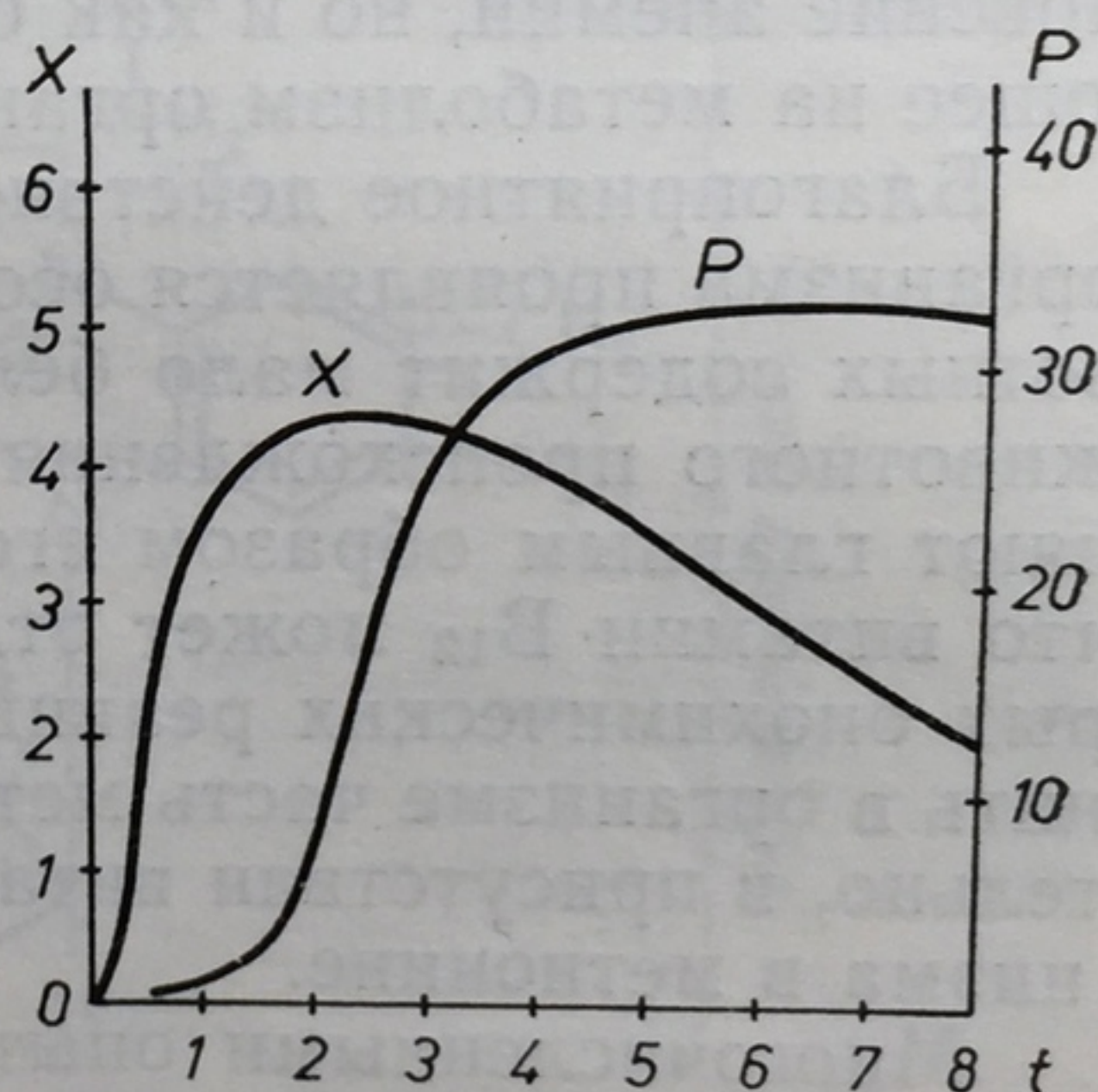


Рис. 58. Динамика образования биомассы и биосинтеза рибофлавина культурой *Eremothecium ashbuii*:

X — биомасса (г/л), P — рибофлавин (мг/л), t — время (сут)



образования биомассы и синтеза рибофлавина продуцентом показана на рис. 58.

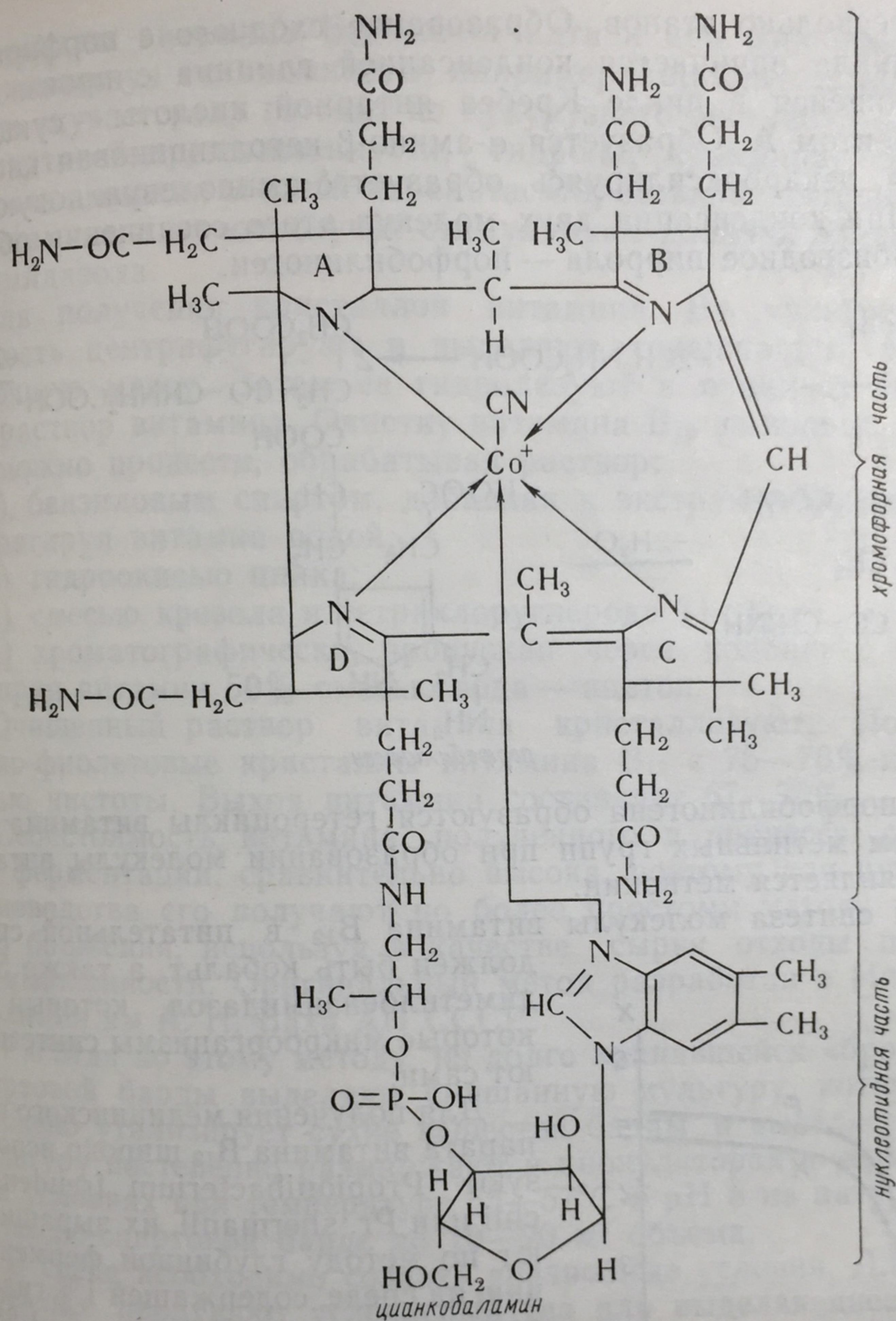
Для получения кормового препарата рибофлавина культуральную жидкость упаривают в вакууме до 30—40% сухих веществ и сушат в распылительных или валково-вакуумных сушилках. Для получения кристаллического препарата рибофлавина культуральную жидкость нагревают до 95—100°C, так как в этих условиях весь рибофлавин выходит из клеток. Затем раствор центрифугируют, центрифугат охлаждают до 18—20°C, устанавливают рН среды 4,5—5,0 и осаждают рибофлавин из раствора при помощи гидросульфита. После декантации осадок промывают, центрифугируют, сушат и размельчают. Полученный технический препарат можно использовать в животноводстве. Медицинский препарат рибофлавина получают перекристаллизацией его из раствора технического рибофлавина в соляной кислоте.

**Цианкобаламин.** Имеет наиболее сложную по сравнению с другими известными витаминами структуру молекулы. Это является одной из причин его сравнительно недавнего открытия. Необходимо подчеркнуть, что цианкобаламин представляет интерес не только как витамин — фактор, предупреждающий возникновение анемии, но и как биологически активное вещество, влияющее на метаболизм организма, стимулирующее рост животных.

Благоприятное действие витамина  $B_{12}$  на развитие животного организма проявляется особо ярко в тех случаях, когда корм животных содержит мало белков, в частности полноценных белков животного происхождения. Такое действие витамина  $B_{12}$  объясняют главным образом его метилирующим действием, т. е. тем, что витамин  $B_{12}$  может отдавать метильные группы для некоторых биохимических реакций. В этом отношении он может замечательно, в присутствии витамина  $B_{12}$  снижается потребность организма в метионине.

Многочисленными опытами на животных установлена высокая биологическая эффективность как кристаллического препарата витамина  $B_{12}$ , так и его кормовых концентратов. В природе витамин  $B_{12}$  синтезируют только микроорганизмы, например *Propionibacterium shermanii*, метанобразующие бактерии, *Bact. methanogenicum* и др. В клетках микроорганизмов встречается около 30 аналогов витамина  $B_{12}$ , однако биологическую активность проявляют только два, в нуклеотидной части молекул которых находится 5,6-диметилбензимидазол или 5-оксибензимидазол. Впервые витамин  $B_{12}$  в кристаллическом виде выделил из печени Фолкер в 1948 г. Это — единственный витамин, содержащий металл кобальт.



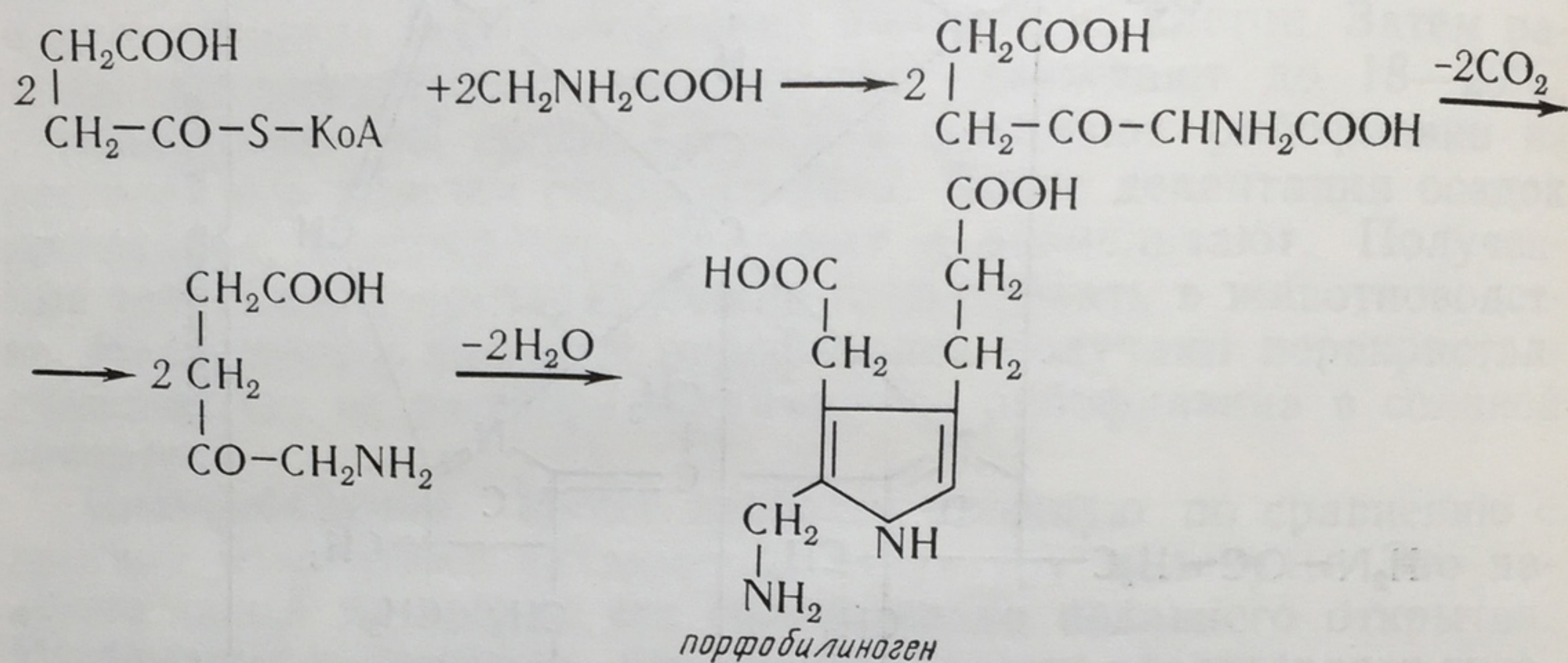


Сходную с порфирином хромофорную часть молекулы, образованную ионом  $\text{Co}^+$  и четырьмя кольцами пиррола, называют также фактором В. Его можно отделить от 5,6-диметилбензимидазола гидролизом соляной кислотой. Если фактор В связан с 5-оксибензимидазолом, то его называют фактором III, последний также обладает биологической активностью. Если нуклеотидную часть составляют производные пурина или пиримидина, то образуются неактивные псевдовитамины.

Биосинтез цианкобаламина у микроорганизмов проходит



через несколько этапов. Образование сходного с порфиринами гетероцикла начинается конденсацией глицина с производным образующейся в цикле Кребса янтарной кислоты — сукцинил-коферментом А. Образуется  $\alpha$ -амино- $\beta$ -кетoadипиновая кислота, которая, декарбоксилируясь, образует  $\delta$ -аминолевулиновую кислоту. При конденсации двух молекул этого соединения образуется производное пиррола — порфобилиноген.



Из порфобилиногена образуются гетероциклы витамина В<sub>12</sub>. Донором метильных групп при образовании молекулы витамина В<sub>12</sub> является метионин.

Для синтеза молекулы витамина В<sub>12</sub> в питательной среде должен быть кобальт, а также 5, 6-диметилбензимидазол, который некоторые микроорганизмы синтезируют сами.

Для получения медицинского препарата витамина В<sub>12</sub> широко используют *Propionibacterium freudenreichii* или *Pr. shermanii*, их выращивают по методу глубинной ферментации, на среде, содержащей 1% гидролизата казеина, 1% пептона, 1,25% лактата натрия, 0,3% дрожжевого экстракта, соли кобальта и 5,6-диметилбензимидазол. В анаэробных условиях ферментация культуры *Propionibacterium* длится 72 ч при температуре 28—30°C.

За это время в культуральной жидкости накапливается 3000—10 000 мкг/л витамина В<sub>12</sub> (рис. 59).

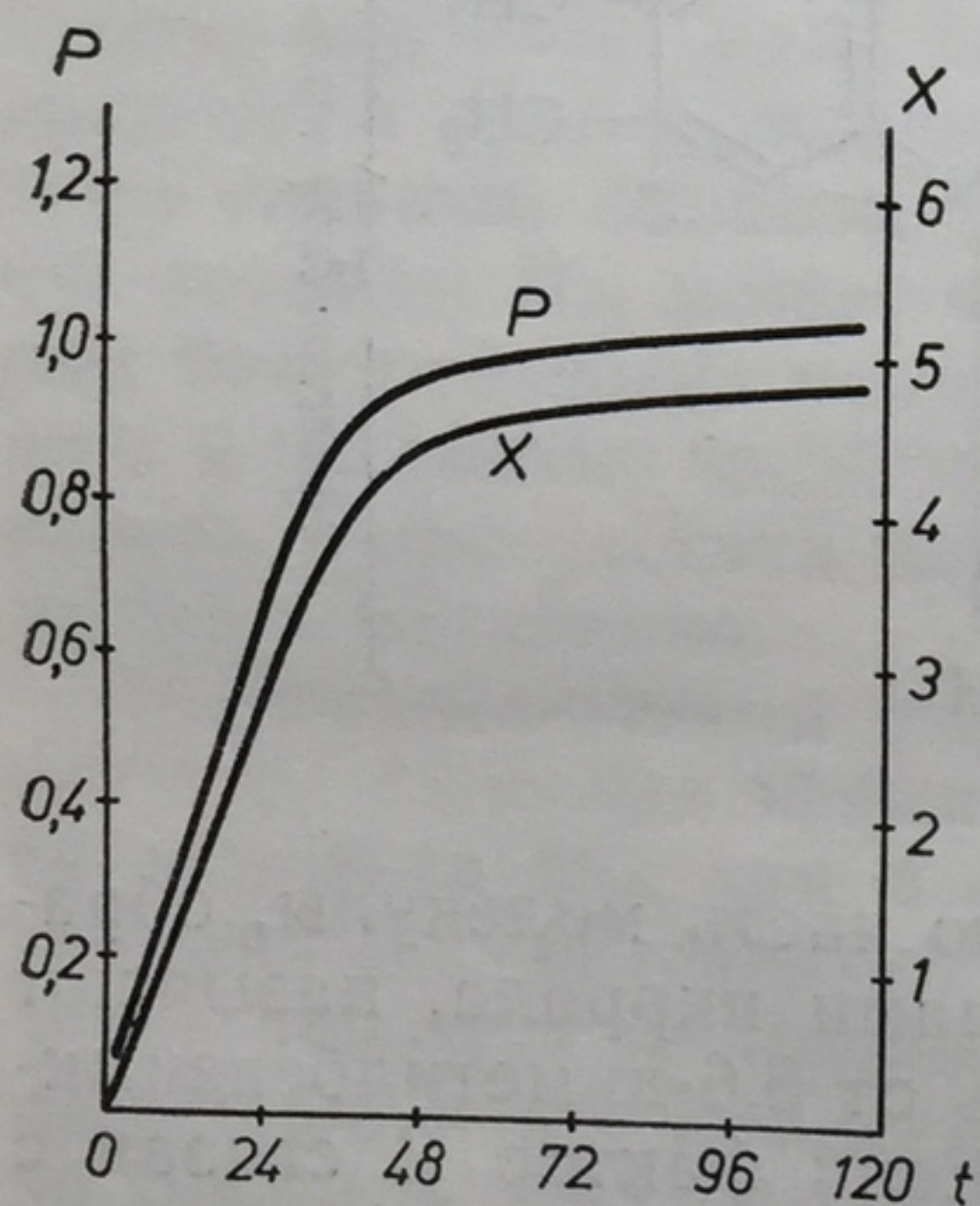


Рис. 59. Образование биомассы культуры *Propionibacterium shermanii*:

X — биомасса (г/л), P — витамин В<sub>12</sub> (мг/л), t — продолжительность ферментации (ч)



Биосинтез витамина  $B_{12}$  может идти и при аэробных условиях, используя актиномицеты, например *Actinomyces olivaceus*. В этом случае среду готовят из кукурузного экстракта или барды спиртовой промышленности, гидроля, крахмала, глюкозы, сульфата аммония и солей кобальта. Образование активной формы витамина и в этом случае стимулируют добавки 5,6-диметилбензимидазола.

Для получения кристаллов витамина  $B_{12}$  культуральную жидкость центрифугируют и выделяют содержащую витамин клеточную массу. Затем ее гидролизуют и очищают полученный раствор витамина. Очистку витамина  $B_{12}$  из водных растворов можно провести, обрабатывая раствор:

- 1) бензиловым спиртом, добавляя к экстракту хлороформ и экстрагируя витамин водой;
- 2) гидроокисью цинка;
- 3) смесью крезола и тетрахлоруглерода (1 : 1);
- 4) хроматографически, пропуская через колонку с  $Al_2O_3$  и элюируя витамин 50% смесью вода — ацетон.

Очищенный раствор витамина кристаллизуют. Получают темно-фиолетовые кристаллы витамина  $B_{12}$  с 75—76%-ной степенью чистоты. Выход витамина составляет 67—70%.

Себестоимость витамина, полученного в процессе стерильной ферментации, сравнительно высока, поэтому для нужд животноводства его получают по более простому методу метанового брожения, используя в качестве сырья отходы пищевой промышленности. Оригинальный метод разработан в Институте биохимии им А. Н. Баха АН СССР.

Работая по этому методу, из долго хранившейся «бродящей» спиртовой барды выделяют смешанную культуру, которая интенсивно утилизирует сухие вещества барды и выделяет метан. Культуру постепенно размножают в инокуляторах в термофильных условиях при температуре 55—57°C и pH 8 на натуральной мелассно-спиртовой барде до 10—20 м<sup>3</sup> объема.

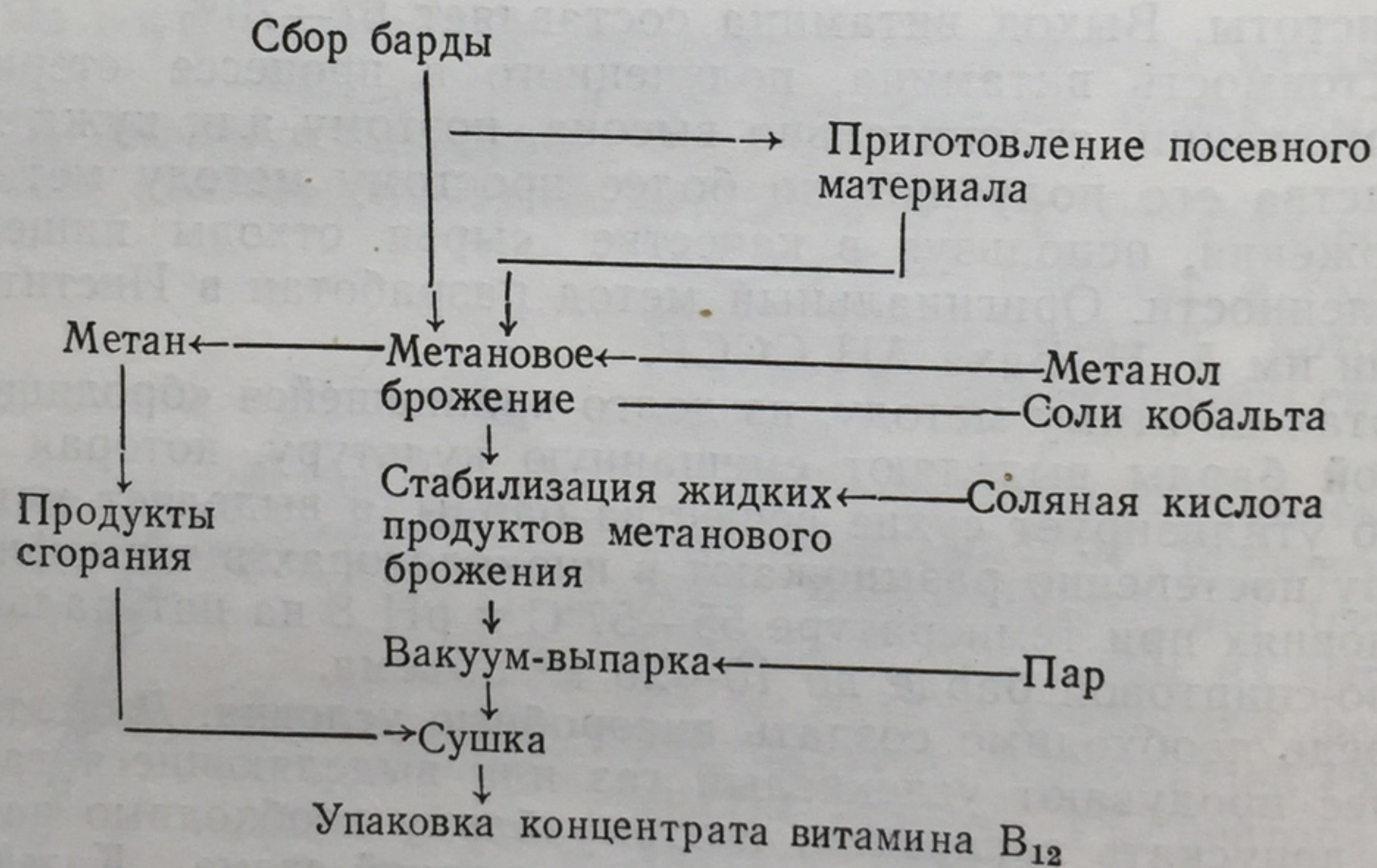
В среде необходимо создать анаэробные условия. Для этого через нее продувают углекислый газ или выделяющиеся газы. Нельзя допускать закисания, поэтому барду необходимо часто разбавлять. Процесс идет по полунепрерывной схеме. Каждый день, после того как часть сброженной жидкости отводится из ферментатора для дальнейшей обработки, в бродящую массу вводят свежую среду. Вначале суточный обмен питательной среды невелик — 3—5% от общего объема. Постоянно надо контролировать кислотность среды, которая не должна превышать 0,3—0,6 мл 0,1 н. NaOH на 10 мл среды. Выделение газа постепенно растет, достигая 10—30 ед. объема на единицу объема среды, а содержание витамина от 200—300 мкг/л увеличивается



до 1000—2000 мкг/л. Для интенсификации синтеза витамина  $B_{12}$  к среде добавляют  $CoCl_2$  до концентрации кобальта 4 г/м<sup>3</sup>, а также 1—1,5% метилового или этилового спирта. Когда выделение газа достигает 20—30 ед. объема на единицу объема жидкости, а количество витамина превысит 1000 мкг/л, всю культуральную жидкость перекачивают в метантанки — 1000 м<sup>3</sup> железобетонные емкости, находящиеся вне здания.

Постепенно, каждый день добавляя 5—10% свежей барды и следя за названными ранее показателями, количество раствора в метантанках доводят до полного рабочего объема. Затем, поддерживая оптимальные для синтеза витамина  $B_{12}$  условия, начинают ежедневно отбирать до 10% сброженной жидкости, содержащей 2—4 г/л сухой биомассы (содержание суммарного сухого вещества в жидкости 2—3%). Количество витамина  $B_{12}$  должно достичь 3000—5000 мкг/л. Культуральную жидкость сгущают в трехкорпусном выпарном аппарате до 35% сухих веществ при температуре от 113 до 62°C.

Схема получения кормового концентрата витамина  $B_{12}$  приведена ниже.



Полученный концентрат — коричневый мелкодисперсный порошок — имеет 3—8%-ную влажность, является очень гигроскопичным, поэтому его герметически упаковывают в полиэтиленовые мешки емкостью 20 кг. Препарат содержит 80—120 мкг/г витамина  $B_{12}$ , рибофлавин и другие витамины группы В, а также бетаин и аминокислоты. В животноводстве применяют дозу 50—100 мг витамина  $B_{12}$  на 1 т сухого корма.



Таблица 17. Химический состав сухого кормового концентрата витамина  $B_{12}$ , продуктов метанового брожения и мелассной барды

Показатели	Мелассная барда	Культуральная жидкость	Концентрат витамина B <sub>12</sub>
Сухие вещества, %	8,50	4,20	94,0
Редуцирующие вещества, %	0,58	0,03	—
Общий азот, %	0,22	0,22	5,20
Белковый азот, %	0,02	0,10	2,50
pH	5,0	8,2	—
Летучие кислоты, %	0,25	1,60	—
Витамин B <sub>12</sub>	—	6400 мкг/л	150 мкг/г
» B <sub>2</sub>	—	3600 мкг/л	130 мкг/г
Минеральные вещества, %	1,48	1,50	36,0

Состав барды, продуктов ферментации и кормового концентрата дан в табл. 17, из которой видно, что во время ферментации в растворе значительно уменьшается количество сухих веществ органического происхождения, поэтому метановое брожение можно рассматривать как эффективный метод очистки сточных вод.

$$\begin{array}{c} \text{CO}_2 + 2[\text{H}] \xrightleftharpoons{\text{формиагидрогеназа}} \text{НСООН (связанная)} \\ \downarrow \\ \text{НСО}-\text{TГФК} \\ \downarrow^{2 [\text{H}]} \\ \text{Серин} \xrightleftharpoons{\text{TГФК}} -\text{CH}_2-\text{TГФК} + \text{глицин} \\ \downarrow^{2 [\text{H}]} \end{array}$$

Из субстратов, содержащих углерод, метан способен выделять многие микроорганизмы, например, *Methanobacterium omelanskii*, *M. barkari*, *Methanosarcina methanica*, *Methanococcus mazei* и др.

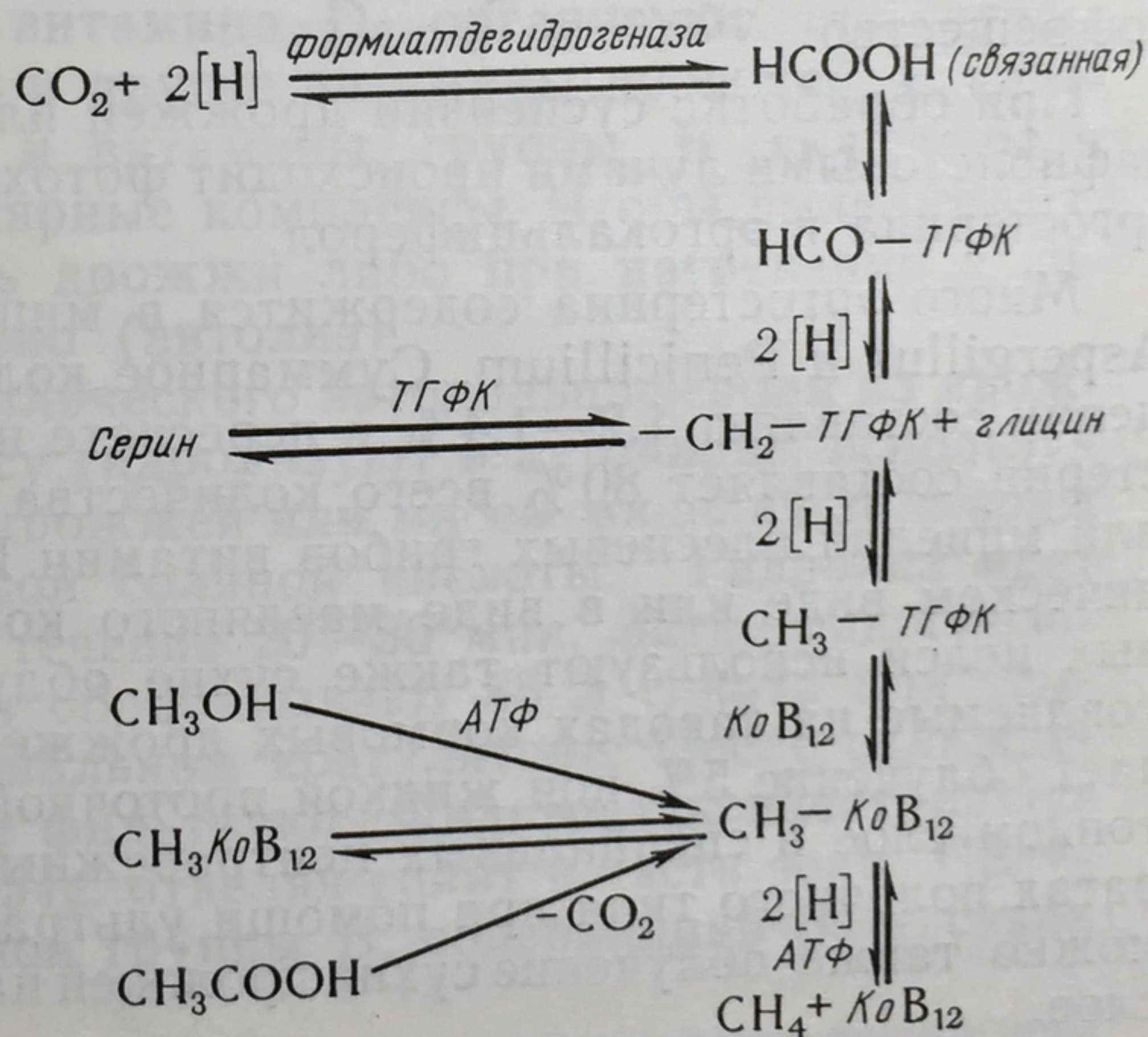


Рис. 60. Схема образования метана

Механизм образования метана в процессе анаэробного метанового брожения показан на рис. 60. Источником углерода для образования молекулы метана может быть  $\text{CO}_2$  (считают, что в этом случае акцептором водорода является витамин  $\text{B}_{12}$ ), муравьиная кислота, метанол, метильная группа уксусной кислоты,



$\beta$ С атом серина, метилкобаламин. В восстановлении муравьиной кислоты принимает участие тетрагидрофолиевая кислота (ТГФК).

В процессе восстановления при участии АТФ от метилкобаламина отделяется метан. Одновременно освобождается и фермент, содержащий витамин  $B_{12}$ .

Используя метановое брожение, на особых синтетических средах, содержащих метиловый спирт, кобальт и другие соли, можно получить более чистый цианкобаламин, который в кристаллическом виде можно использовать в медицине.

### Эргокальциферол ( $D_2$ )

Клетки хлебопекарных дрожжей содержат 0,2—0,3% эргостерина, являющегося предшественником (провитамином) витамина  $D_2$ .

В специальных условиях культивирования при усиленной аэрации и увеличенном количестве посевного материала содержание эргостерина можно увеличить до 2,3—5% в пересчете на сухое вещество.

При обработке суспензии дрожжей или сухих дрожжей ультрафиолетовыми лучами происходит фотохимическое превращение эргостерина в эргокальциферол.

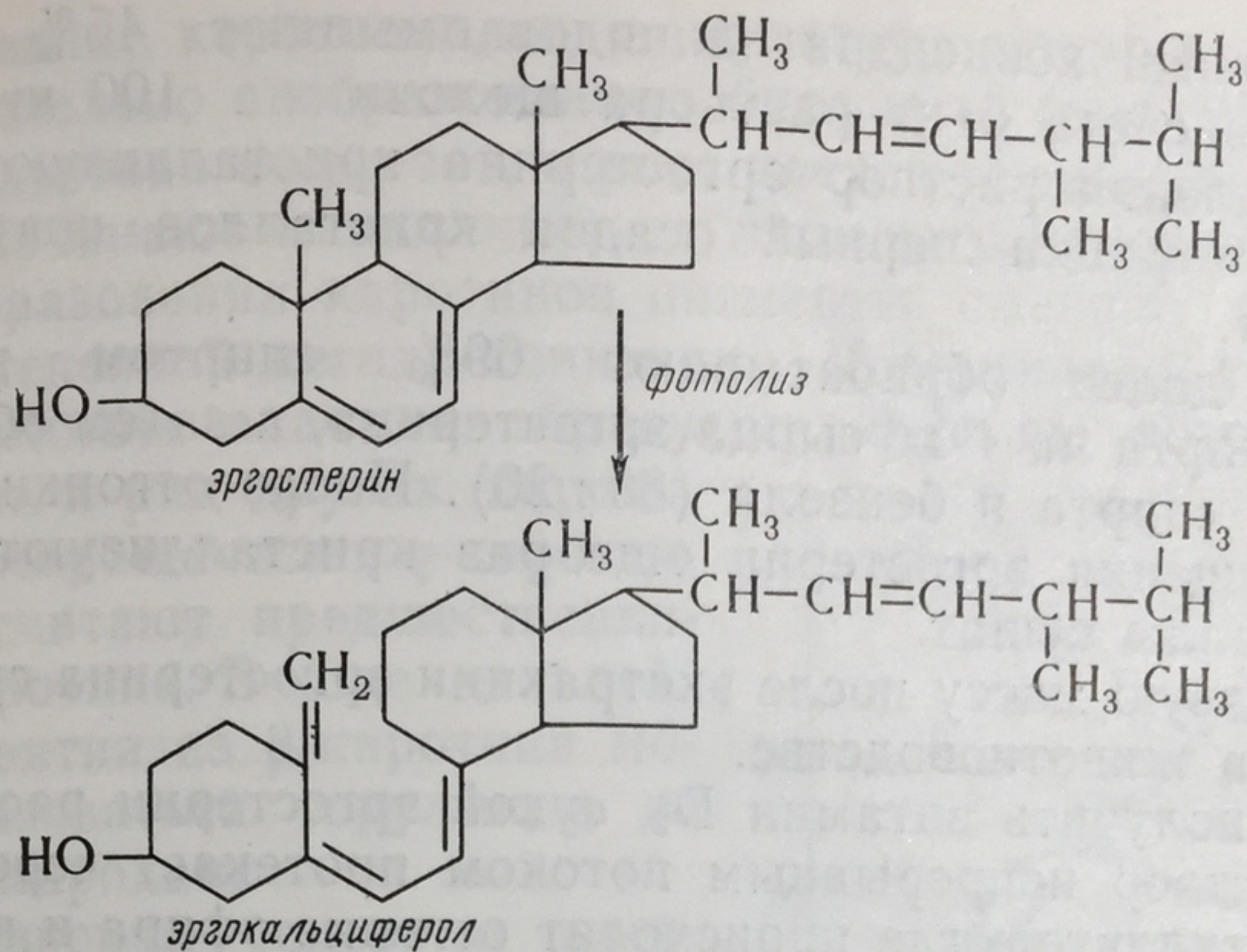
Много эргостерина содержится в мицелии плесневых грибов *Aspergillus* и *Penicillium*. Суммарное количество стерина в мицелии составляет 1,2—1,4% в пересчете на сухое вещество, эргостерин составляет 80% всего количества стерина. Из дрожжей или мицелия плесневых грибов витамин  $D_2$  получают в кристаллическом виде или в виде масляного концентрата. Для кормовых целей используют также сухие облученные дрожжи, изготавливаемые на заводах кормовых дрожжей. Хорошие результаты дает облучение 5%-ной жидкой проточной суспензии дрожжей в тонком слое в специальных центробежных аппаратах или аппаратах полочного типа при помощи ультрафиолетовых ламп. Возможно также облучение сухих дрожжей на транспортере в тонком слое.

Оптимальная длина световых волн для фотолиза эргостерина 280—313 нм.

На практике используют ультрафиолетовые лампы типа РК-2. Для получения 1 и. е. витамина  $D_2$  необходимо  $9,3 \cdot 10^{-13}$  квантов энергии.

В реакциях фотолиза образуется ряд побочных продуктов — эргостерин, люмистерин, протогистерин, прокальциферол, эргокальциферол.





При слишком интенсивном и длительном облучении могут образоваться дальнейшие продукты фотолиза — токсистерин и супрастерин, являющиеся ядовитыми.

Получение препарата витамина D<sub>2</sub> организуют так, чтобы можно было использовать и другие витамины дрожжей. В клетках дрожжей эргостерин и витамины группы В включены в различные высокомолекулярные комплексы. Чтобы выделить их, необходимо гидролизовать дрожжи либо при нагревании с кислотой, либо ферментативно (автолиз).

Для получения кристаллического эргокальциферола из дрожжей или мицелия, биомассу гидролизуют в автоклаве, используя на 100 кг размельченных дрожжей или массы мицелия 20 л воды и 10 мл концентрированной соляной кислоты. Гидролиз идет при температуре 110°C в течение 20—30 мин. Затем гидролизованную массу 40—50 мин обрабатывают 85 л спирта при температуре 75—78°C в специальном коагуляторе. После охлаждения массы до 10—15°C ее фильтруют. Фильтрат концентрируют в вакуум-выпарном аппарате, отделяя спирт и часть воды. Получают концентрат витаминов группы В, содержащий 50% сухих веществ.

Массу, оставшуюся после фильтрации, промывают водой, затем отгоняют спирт и воду и полученную пасту сушат до влажности 2% и размельчают.

Порошок дрожжей при температуре 78°C в экстракторе обрабатывают трехкратным объемом спирта-ректификата.

После отделения раствора осадок еще раз экстрагируют спиртом, из экстракта в вакуум-аппарате отделяют спирт, а остаток фильтрата сгущают до 70%-ного содержания сухих веществ. Из 100 кг дрожжей получают 20—25 кг липидного концентрата.



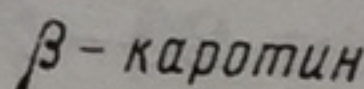
Сырец далее обрабатывают 69% спиртом из расчета 10 кг спирта на 1 кг сырца эргостерина, а затем обрабатывают смесью спирта и бензола (80 : 20). После отгонки растворителя и сгущения эргостерин еще раз кристаллизуют, полученные кристаллы сушат.

Чтобы получить витамин D<sub>2</sub>, сухой эргостерин растворяют в эфире. Раствор непрерывным потоком протекает через облучатель в дистиллятор, где происходит отгонка эфира и концентрирование раствора. Раствор витамина D<sub>2</sub> фильтруют и после стандартизации его спиртом или маслом используют как концентрат витамина D<sub>2</sub>.

Кристаллы витамина D<sub>2</sub> белого цвета, температура плавления 113—114°C.

Каротиноидами называют встречающиеся в клетках растений и микроорганизмов желто-оранжевые пигменты, часть которых биологически активна. По химическому строению это полиены, молекулы которых содержат до 40 атомов углерода. Если в молекуле каротиноидов содержатся только углерод и водород, то их называют каротинами, а если в молекуле содержится и кислород — то их называют ксантофилами.

Биологически наиболее активным является провитамин витамина А —  $\beta$ -каротин, в молекуле которого содержится два кольца  $\beta$ -ионона





Образование каротиноидов в культуре микроорганизмов не идет параллельно с образованием биомассы (рис. 61). Когда в среде использован весь азот, а рост клеток уменьшается, тогда в биомассе начинают накапливаться липиды и каротиноиды.

При образовании каротинов пигменты сменяют друг друга путем постепенной дегидрогенизации. Установлено, что у дрожжей *Rhodotorula* вначале образуется фитоин, который через фитофлуин и ряд других каротиноидов превращается в  $\gamma$ -каротин, который считают предшественником  $\beta$ -каротина. В ходе дальнейшего развития из  $\beta$ -каротина может образоваться торулин, а из него торулародин.

Каротиноиды содержат клетки многих бактерий (микобактерии, микрококки), дрожжей (*Rhodotorula*, *Sporobolomyces*), плесневых грибов (*Blakeslea trispora*). Особенно богата  $\beta$ -каротином биомасса *Bl. trispora*, содержащая до 10—50 мг  $\beta$ -каротина на 1 г биомассы.

Эта культура образует (+) — и (—) — формы (гетероталлизм). Посевной материал для каждой формы готовят отдельно, а основную ферментацию ведут в одном аппарате. Для выращивания используют как метод поверхностной, так и глубинной культуры.

При работе методом глубинного культивирования среду готовят на доступных источниках углерода (углеводы, кислоты), часто из мелассных или зерновых заторов, концентрация которых составляет в среде 7—8%.

Как источник азота можно использовать минеральные соли или органические вещества. Кроме того, к среде добавляют 4—5% растительного масла богатого олеиновой и линоленовой кислотами, а также около 0,1%  $\beta$ -ионона.

Выращивание посевного материала длится 48 часов, основная ферментация — 5—6 сут при температуре 28°C, pH среды 6,2—6,7. Во время ферментации среду интенсивно аэрируют. Интенсивный синтез каротиноидов начинается после использования азота питательной среды. Образование каротиноидов стимулируют не только упомянутые вещества — жирные кислоты и  $\beta$ -ионон, но и экстракты цитрусовых, помидоров, моркови, дрожжей, а также керосин.

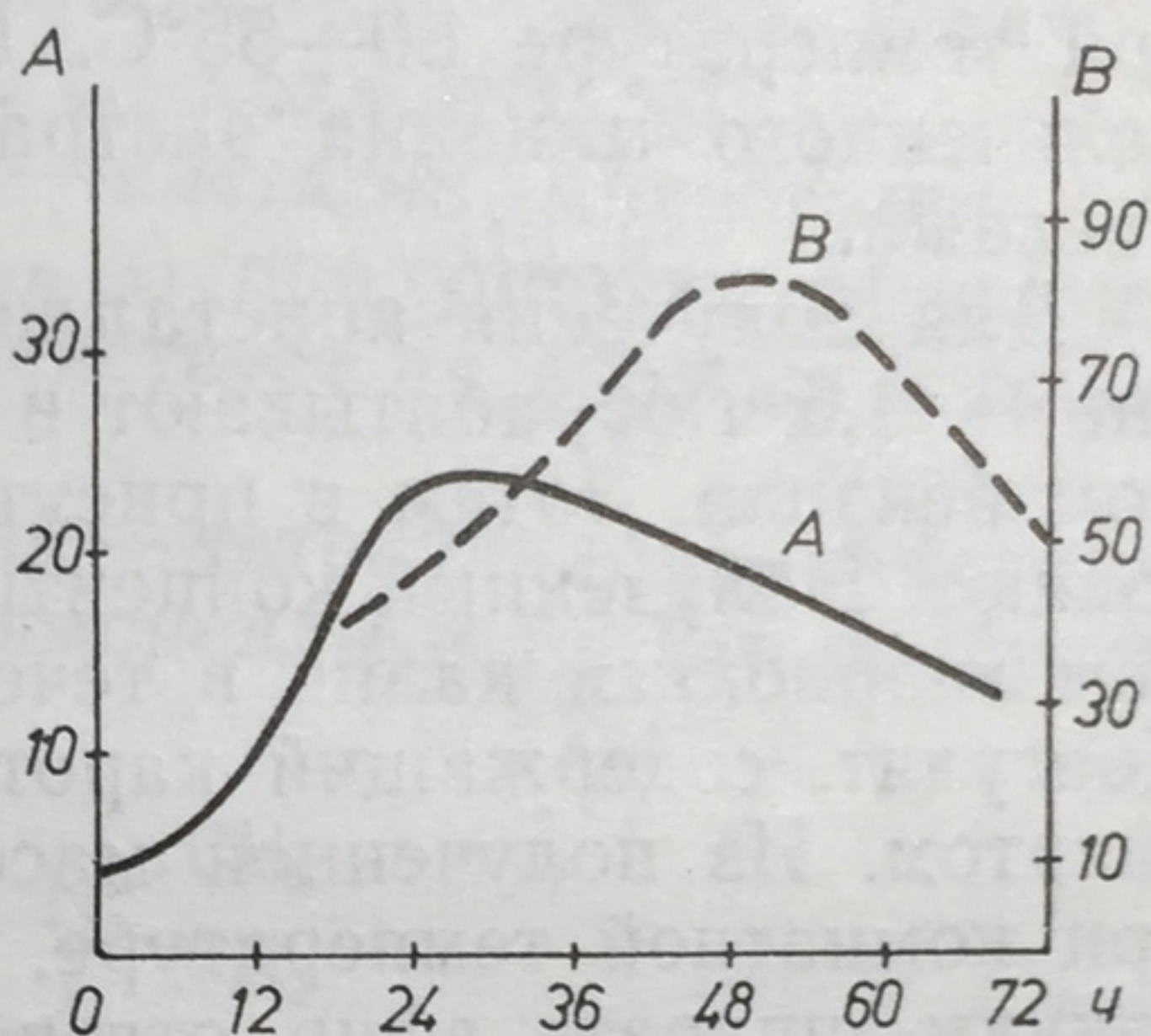


Рис. 61. Динамика образования биомассы и биосинтеза каротина культурой дрожжей *Rhodotorula gracilis*  
A — биомасса (г/л), B — каротин (мкг/г)



Во время ферментации желательно добавить в питательную среду поверхностно-активные вещества (0,1%) для предотвращения образования жировых конгломератов.

За время ферментации *Blakeslea trispora* накапливает 1,0—1,7 кг  $\beta$ -каротина на каждый кубический метр культуральной жидкости. Это количество  $\beta$ -каротина равно количеству последнего, полученного в течение года с 1 га посевов моркови.

После ферментации мицелий фильтруют и сушат в вакууме при температуре 50—55°C. Каротин извлекают из сухого размельченного мицелия экстракцией эфиром или растительными маслами.

Для получения кристаллического каротина биомассу в течение 1—1,5 ч обрабатывают в экстракторе четырехкратным объемом бензола. Затем в присутствии углекислоты  $\text{CO}_2$  бензол отгоняют. Полученный концентрат каротина омыляют 10% раствором гидроокиси калия в течение 20 мин при температуре 50°C. Коагулят, содержащий каротин, фильтруют, осадок промывают спиртом. Из полученной массы каротин экстрагируют эфиром при комнатной температуре, затем фильтруют, из фильтрата в вакуум-аппарате эфир отгоняют и получают насыщенный раствор каротина. Кристаллизацию ведут вначале при комнатной температуре, затем при 5°C. Выпавшие кристаллы фильтруют, промывают спиртом и сушат в вакуумных сушилках.

Кристаллы каротина должны быть однородными, фиолетово-красного цвета с металлическим отливом. Содержание каротина в препарате должно быть не ниже 90%, температура плавления кристаллов не ниже 160°C.

### ПОЛУЧЕНИЕ АНТИБИОТИКОВ

Антибиотики — органические соединения. Они синтезируются живой клеткой и способны в небольших концентрациях замедлить развитие или полностью уничтожить чувствительные к ним виды микроорганизмов. Их продуцируют не только клетки микроорганизмов и растений, но и клетки животных. Антибиотики растительного происхождения называют фитонцидами. Это хлорелин, томатин, сативин, получаемый из чеснока, и алин, выделяемый из лука.

Вначале антибиотики классифицировали по их продуцентам — бактериям, актиномицетам, грибам. По биологическому воздействию антибиотики разделяются на антибактериальные, антифунгицидные (противогрибковые) и противораковые. К антибактериальным антибиотикам относятся пенициллин, эритромицин, олеандомицин, карбомицин и другие, угнетающие рост грамположительных бактерий; а также тетрациклин, неомицин,

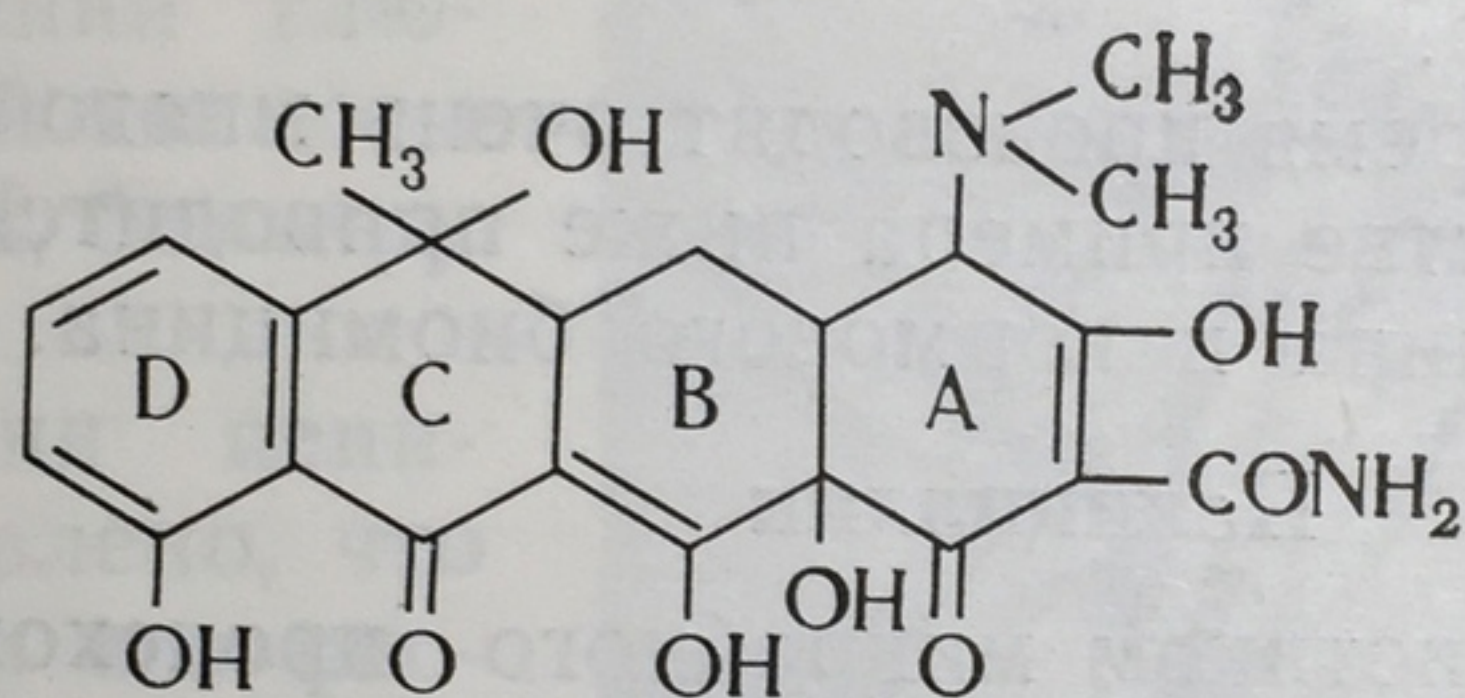


стрептомицин, полимиксин, грамицидин и другие, угнетающие рост грамотрицательных бактерий; стрептомицин, биомицин, циклосерин и другие антибиотики, обладающие противотуберкулезным действием. В группу противогрибковых антибиотиков входят нистатин, гризеофульвин, леворин, кандицидин и амфотерицин В. Противораковыми антибиотиками являются актиномицин и митомицин С и др.

По химическому строению антибиотики также делят на группы (по М. М. Шемякину и А. С. Хохлову):

1. Алифатические антибиотики — нистатин, микостатин, фунгицидин. Нистатин ( $C_{16}H_{15}NO_{18}$  или 19) продуцируют *Streptomyces fungicidicus*, *Str. noursei*. Он действует на дрожжи и грибы, но не влияет на бактерии.

2. Алициклические антибиотики — тетрациклин — действуют на стафилококки, стрептококки, салмонеллы и др. Его продуцент *Str. viridofaciens*.

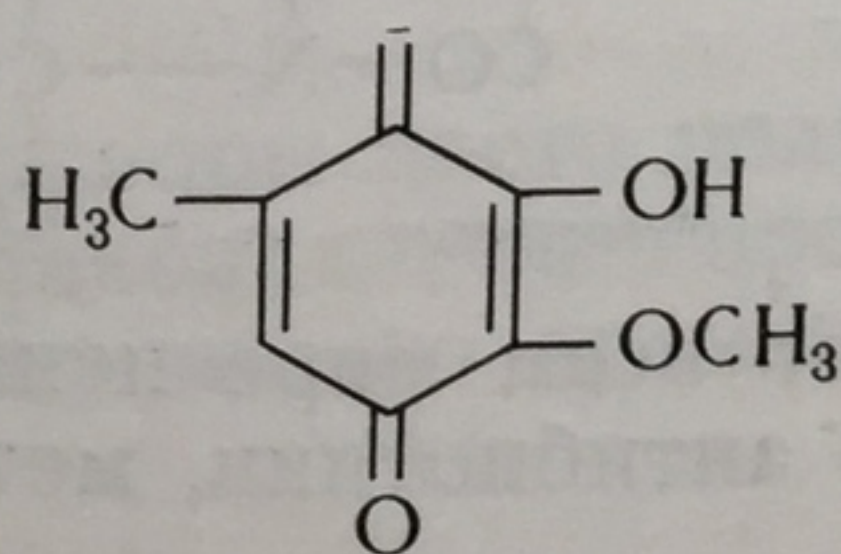


тетрациклин

Тетрациклин получают также путем дехлорирования хлортетрациклина. Если в В-кольце молекулы тетрациклина у верхнего атома углерода имеется —ОН группа, тогда это соединение (также широко известное антибиотическое вещество) называют окситетрациклином. Его продуцируют *Str. rimosus* и другие культуры.

Если у верхнего атома углерода D-кольца молекулы тетрациклина находится атом хлора, то это вещество называется хлортетрациклином или биомицином. Оно используется не только в медицине, но и как стимулятор при откармливании домашних животных.

3. Антибиотики — хиноны (например, фумигатин, продуцируемый многими видами *Aspergillus*), воздействуют на стафилококки, стрептококки, *Vibrio cholerae* и др.



фумигатин



4. Азотсодержащие гетероциклические антибиотики — пенициллин и его производные продуцируются *Penicillium rotatum* и особенно *P. chrysogenum*. Он воздействует на грамположительные бактерии — *Salmonella*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus faecalis*, *Vibrio* и др.

5. Стрептомицины и им подобные антибиотики. Стрептомицин продуцируют *Streptomyces griseus* или *Actinomyces streptomycini* (по классификации советских ученых). Он воздействует на грамотрицательные бактерии, а также на некоторые грамположительные бактерии.

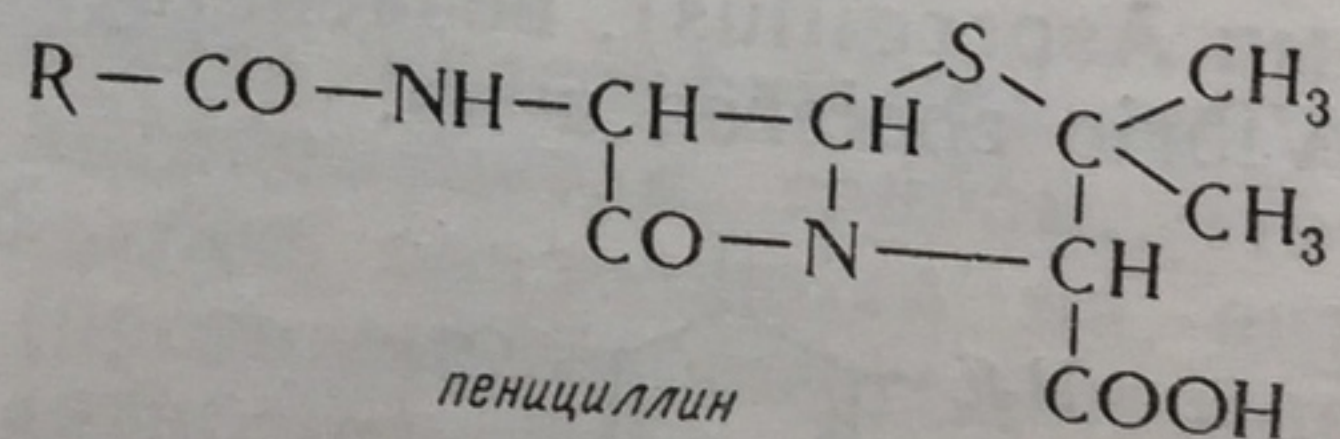
6. Содержащие кислород гетероциклические антибиотики — гризеофульвин (продуцирует *Penicillium griseofulvum*) и др.

7. Антибиотики — полипептиды — грамицидин, полимиксин и др. По строению они являются циклопептидами из остатков L и D-минокислот. Полимиксин продуцируют *Bacillus polymyxa*, *B. aerospogus* и др.

В настоящее время производят очень много различных антибиотиков. В качестве примера ниже приводится технология получения пенициллина и кормового биомицина.

### Пенициллин

Первым антибиотиком микробного происхождения, который начали производить промышленным путем, был пенициллин. Вначале его получали методом поверхностного культивирования. Технология была весьма примитивна — продуцент культивировали в колбах или бутылках. Потребность в пенициллине была очень высока и объем его производства, хотя и в примитивных условиях, быстро увеличивался. Для культивирования продуцента использовали даже молочные бутылки, так как имелись машины для их мытья и обработки. В каждую бутылку помещали питательную среду слоем толщиной 1—4 см, что обеспечивало необходимые условия аэрации. Бутылки помещали в специальные корзины, стерилизовали, а затем охлаждали. Сухие споры или их водную суспензию вносили в бутылки особыми пульверизаторами или при помощи пипеток и ферментировали 5—10 сут при температуре 24°C.



пенициллин

В настоящее время во всем мире пенициллин получают, так же как и многие другие антибиотики, методом глубинного культивирования.



В качестве продуцентов пенициллина широко используют штаммы культуры *Penicillium chrysogenum*, виды *Penicillium* образуют споры (конидии) (рис. 62). В развитии мицелия наблюдается ряд различных фаз (см. приложение 16 цветное). В начале и середине развития мицелия в клетках накапливаются жиры. Позже их количество уменьшается, появляются вакуоли с гранулами рибонуклеополифосфатов, затем начинается автолиз. Интенсивный синтез пенициллина начинается при наличии большого количества биомассы мицелия, при полном использовании глюкозы и молочной кислоты в среде и при рН, близком к нейтральному.

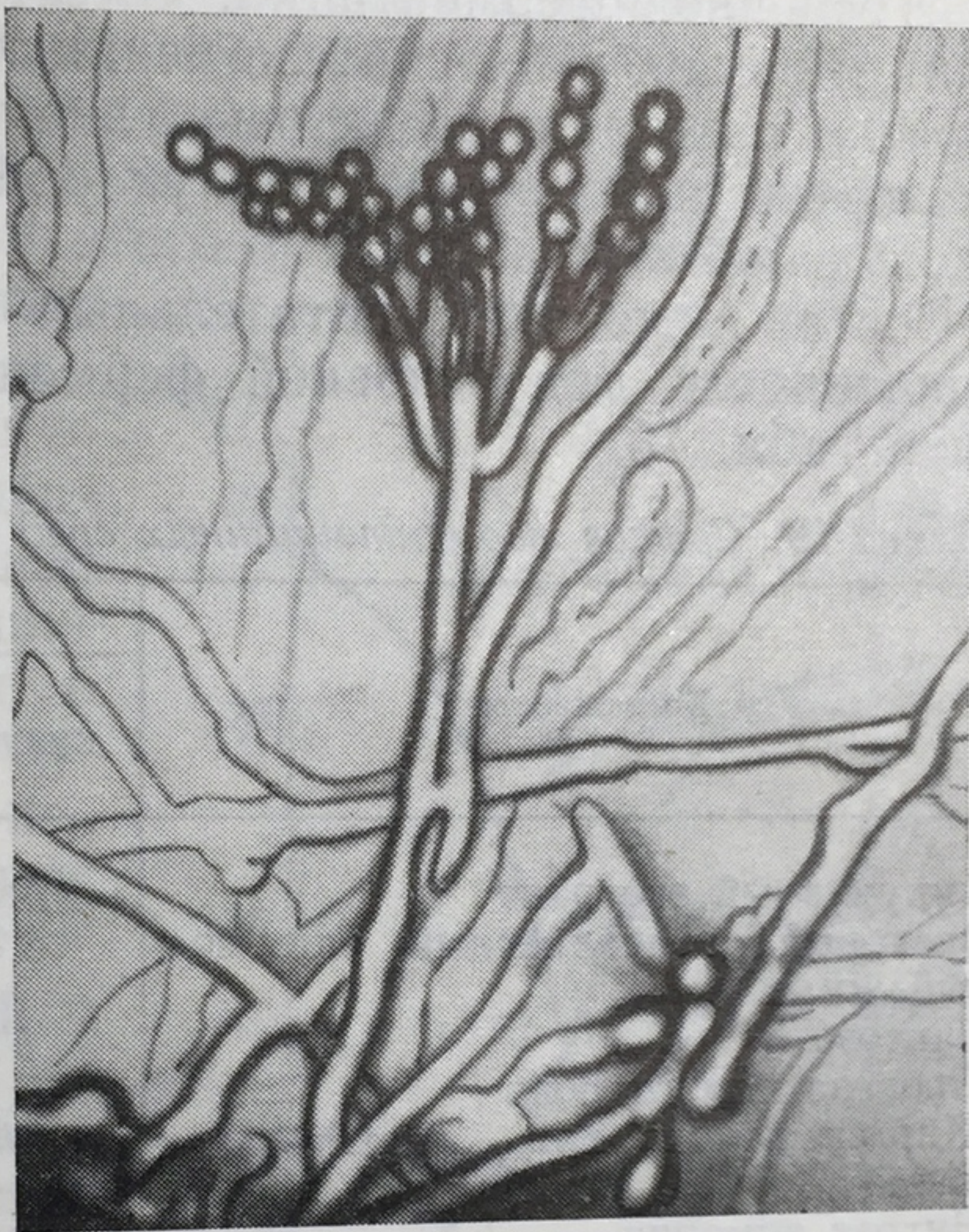


Рис. 62. Плесневый гриб рода *Penicillium* с конидиями

При изучении пенициллина установлено, что среди продуктов его кислотного гидролиза всегда присутствует  $\beta$ -диметилцистеин. Введением в состав питательной среды веществ с мечеными атомами  $C^{14}$ ,  $N^{15}$ ,  $S^{32}$  был изучен механизм биосинтеза пенициллина.

Считают, что бензилпенициллиновая кислота синтезируется из L-цистина, фенилуксусной кислоты и диметилпировиноградной кислоты.

Для получения пенициллина вначале размножают споры. Их можно выращивать на агаризированных средах, в состав которых входят, например, 0,5% мелассы, 0,5% пептона, 0,4% поваренной соли, 0,01% однозамещенного фосфата калия и 0,005% сульфата магния. Споры выращивают при температуре 25—27°C 4—5 сут.

В промышленности споры часто получают, выращивая мицелий в стеклянных флаконах на просяной среде. Высушенный споровый материал можно хранить даже при комнатной температуре.



Полученный споровый материал используют для засева инокуляторов (1—3 флакона на аппарат, где мицелий размножают до количества 5—10% от объема посевных ферментаторов).

В посевных ферментаторах мицелий выращивают 12—18 ч, 15—20% объема культуральной жидкости используют для начала основной ферментации. Питательные среды для выращивания мицелия и биосинтеза пенициллина готовят обычно из кукурузного экстракта, лактозы, глюкозы, минеральных веществ и некоторых препаратов фенилуксусной кислоты — предшественников антибиотика.

Состав некоторых питательных сред, используемых в промышленности для основной ферментации пенициллина, приведен в табл. 18.

Таблица 18. Состав ферментационных сред (в %) для получения пенициллина

Компоненты	Среда		
	кукурузная	жмыховая	жировая
Кукурузный экстракт	2,0—3,0	—	2,0—3,0
Ореховый, подсолнечный или соевый жмых	—	2,0—4,0	—
Лактоза	5,0	5,0	1,0
Глюкоза или гидроль	1,5	1,5	1,5
Жир кашалота или растительные масла	0,5—0,1	0,5—0,1	2,5—3,5
Нитрат аммония	0,4	0,4	0,4
Сульфат натрия	0,05	0,05	0,05
Однозамещенный фосфат калия	0,4	0,4	0,4
Сульфат магния	0,025	0,025	0,025
Тиосульфат натрия	0,2	0,2	0,2
Мел	0,5—1,0	0,5—1,0	0,5—1,0
Предшественники пенициллина	0,3—0,4	0,3—0,4	0,3—0,4

Для стабилизации реакции среды используют мел. Ферментацию ведут при температуре 22—26°C, в границах pH среды от 5,0 до 7,5, при интенсивной аэрации среды (1 ед. объема воздуха в 1 мин на 1 ед. объема среды). В течение 4 сут количество пенициллина достигает максимума и ферментацию прекращают. Динамика образования мицелия, биосинтеза пенициллина и потребление лактозы из среды показано на рис. 63. Мицелий отделяют фильтрацией (зачастую в вакуум-фильтрах цилиндрического типа). Его можно использовать в животноводстве как источник белков и витаминов, а из культуральной жидкости выделяют пенициллин.

После отделения мицелия в фильтрате содержится 3—6% сухих веществ, из которых 30—40% составляют минеральные



вещества, а 15—30% пенициллин. Содержание редуцирующих веществ (по Бертрану) в нативном растворе обычно составляет 0,1—0,4%. Кроме того, в нем содержится 50—200 мг/100 г, а иногда даже до 700 мг белка на 100 г раствора, что очень затрудняет выделение пенициллина. Белковые примеси удаляют, используя различные методы предварительной обработки, например, осаждение солями многовалентных металлов (Al, Fe, Zn), коагулирование танином или высокой температурой (65—70°C) при pH среды 5,5—6,0. В этих процессах потери пенициллина составляют 5—15%. После этого пенициллин экстрагируют органическими растворителями (бутилацетатом или амилацетатом), которые не смешиваются с водой. В это время важно выдерживать pH среды в интервале 1,9—2,0. В результате экстракции чистота продукта возрастает в 4—6 раз. Затем пенициллин из бутилацетатного экстракта при помощи раствора бикарбоната натрия (pH среды 6,6—7,2) растворяют в воде, получая раствор с 5—7% содержанием сухих веществ и активностью 30 000—50 000 ед./мл. Для очистки пенициллина его снова экстрагируют органическим растворителем (чаще всего бутилацетатом). При экстракции соотношение фаз 1:0,5—1:1, активность экстракта 50 000—70 000 ед./мл. Выход пенициллина составляет примерно 86% от его количества в культуральной жидкости.

В последнее время экстракцию и химическую очистку пенициллина ведут по непрерывной схеме. Чтобы использовать пенициллин и другие антибиотики в медицине, выделению и очистке активных веществ необходимо уделять особое внимание. Получение антибиотиков отличается от других отраслей микробиологического биосинтеза именно тем, что содержание активных веществ в культуральной жидкости весьма незначительно, поэтому их химическое выделение усложняется, кроме того, требуется гарантия высокой степени чистоты этих веществ.

При определении активности антибиотиков очень широко используют микробиологические методы. В стерильную чашку

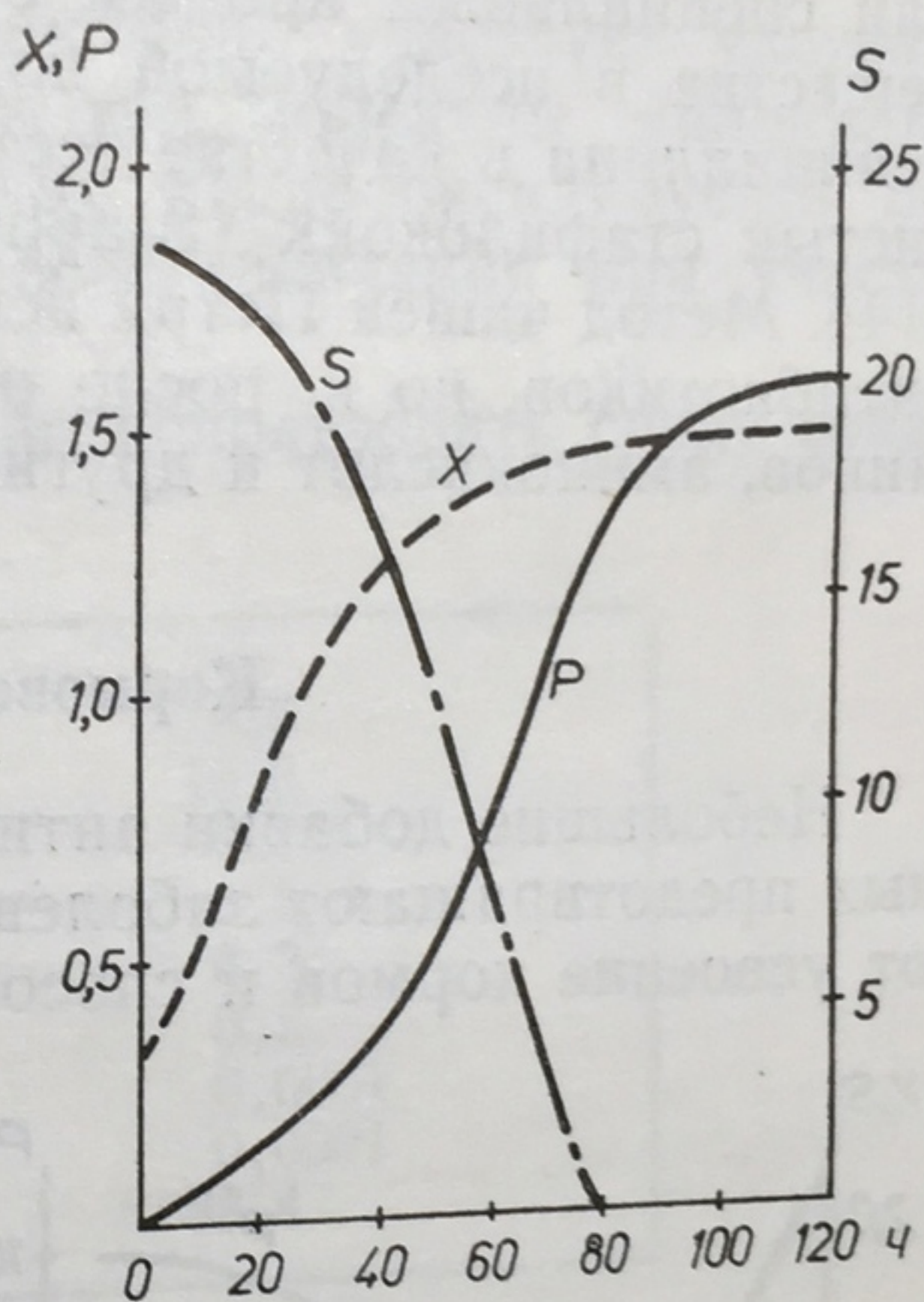


Рис. 63. Динамика биосинтеза пенициллина, образования мицелия и ассимиляции лактозы:  
X — сухой мицелий (мг/100 г), Р — концентрация пенициллина (1000 ед./мл), S — концентрация лактозы (мг/мл)



Петри заливают 21 мг агаризированной среды и дают ей затвердеть. На поверхность агара наливают 4 мг агаризированной среды другого состава вместе с тест-культурой, чувствительной к данному антибиотику. После затвердевания и этого слоя агаризированной среды, на его поверхность вразброс помещают вертикально четыре стерильных цилиндра, длина которых 10 мм, и диаметр 6 мм, и наполняют их стандартными растворами антибиотиков определенной концентрации, а также исследуемым раствором. Приготовленные таким образом чашки Петри помещают в термостат при 37°C. Через 16—18 ч определяют диаметр цилиндрической зоны, где не росла тест-культура, и по таблицам или специальным кривым определяют концентрацию активного вещества в исследуемой жидкости. При проверке активности пенициллина в качестве тест-культуры обычно используют золотистый стафилококк (*Staphylococcus aureus*) штамм 209-Р или 9144. Метод чашек Петри используют не только для определения антибиотиков, но и, после определенной модификации, — витаминов, аминокислот и других активных веществ.

#### Кормовой биомицин (хлортетрациклин)

Небольшие добавки антибиотиков в суточный рацион животных предотвращают заболевания домашних животных, улучшают усвоение кормов и способствуют приросту живой массы животных.

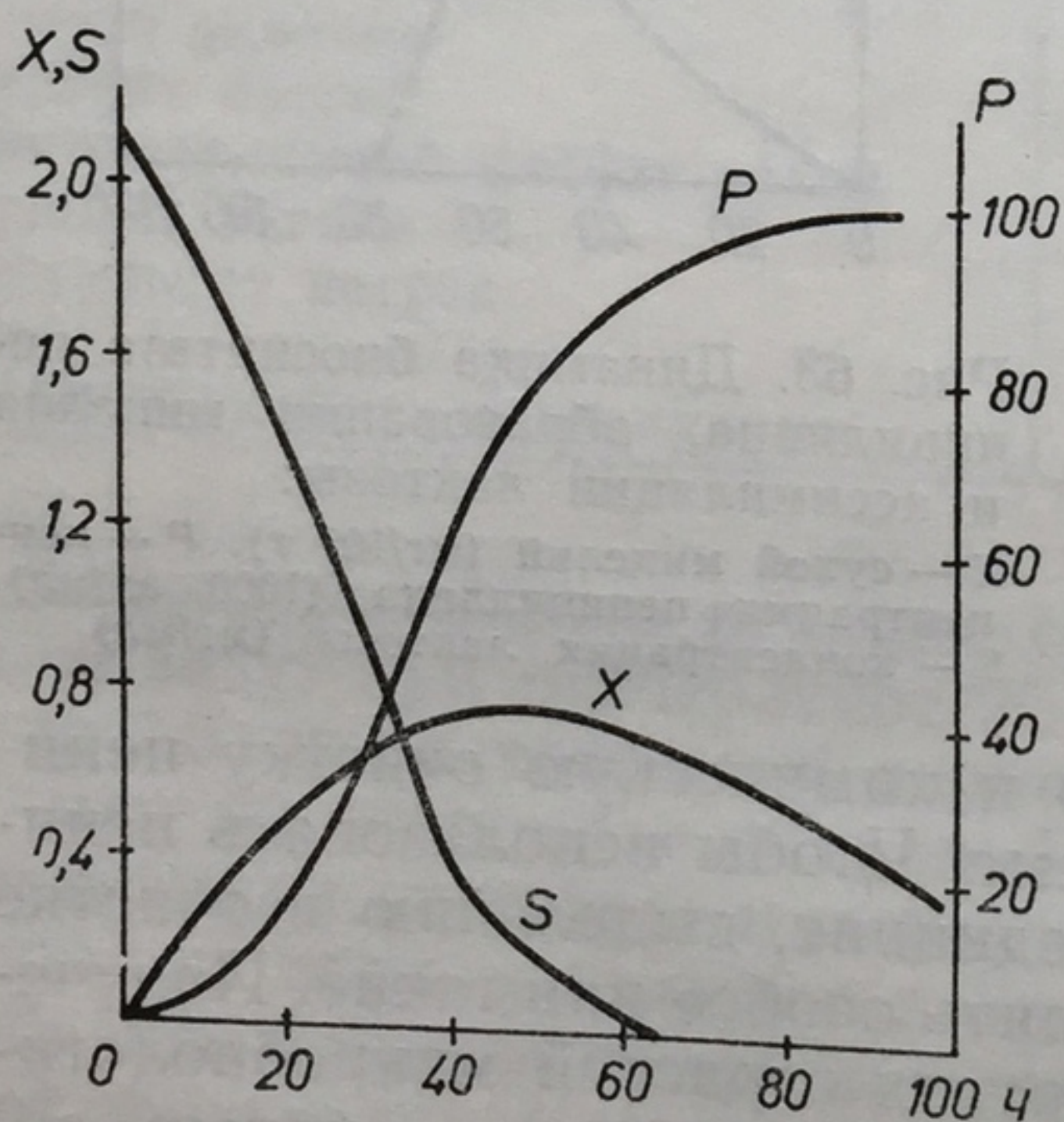


Рис. 64. Динамика биосинтеза биомицина, образования мицелия и ассимиляции углеводов:

P — концентрация биомицина (%), X — количество сухого мицелия (%), S — количество углеводов (%)

Кормовые антибиотики получают по упрощенной технологии из дешевых видов сырья, не выделяя их в чистом виде из культуральной жидкости. Хотя биомицин является антибиотиком медицинского назначения, наиболее широко в настоящее время его используют в животноводстве.

Биомицин продуцируют актиномицеты *Actinomyces aureofaciens*. Это похожие на грибы организмы. Так же, как микроскопические грибы, они образуют мицелий, но с более тонкими гифами диаметром не более 0,1—0,8 мкм. В гифах молодого мицелия хорошо видна гомогенная протоплазма. При



старении клеток в протоплазме появляются гранулярные структуры, вакуоли, начинается автолиз клеток.

В условиях глубинного выращивания культуры актиномицетов размножаются вегетативно, путем отделения частей гифов, в виде коротких нитей, палочек или даже в виде шариков. На твердых питательных средах актиномицеты образуют колонии мицелия, на поверхности которых потом развиваются спорангии, содержащие круглые, овальные или цилиндрические споры. Во время ферментации, примерно через 50 ч, когда масса мицелия достигает максимума, синтез антибиотика еще продолжается, достигая максимума через 60—70 ч ферментации (рис. 64).

Доказано, что в биосинтезе биомицина участвует уксусная кислота в виде ацетилкоэнзима А и три молекулы малонилкофермента А, причем каждая из них декарбоксилируется при конденсации. Далее идут реакции восстановления при участии НАДФ·Н<sub>2</sub> и циклизация.

Для получения биомицина можно использовать среду следующего состава (в %):

Мука	5,0
Зерновая барда	10,0
Нитрат аммония	0,7
Карбонат кальция	0,5
Хлорид натрия	0,3
Жир кашалота	0,2
Бензилроданит	0,0001
Хлорид кобальта	0,0001
Вода	83,4

В качестве посевного материала используют споры, которые при температуре 2—6°C можно хранить до 3 мес. Для размножения культуры в колбах используют более простую среду (3% муки, 3% кукурузного экстракта). Процесс идет при рН 6,7—6,8, температуре 28—30°C в течение 24—30 ч. Далее посевной материал размножают в посевных ферментаторах до количества, равного 11—12% рабочего объема главного ферментатора. Для этого также используют питательную среду, состоящую из муки и кукурузного экстракта. Процесс ферментации идет в аэробных условиях при 27—28°C, рН 6,6—6,7 в течение 30 ч.

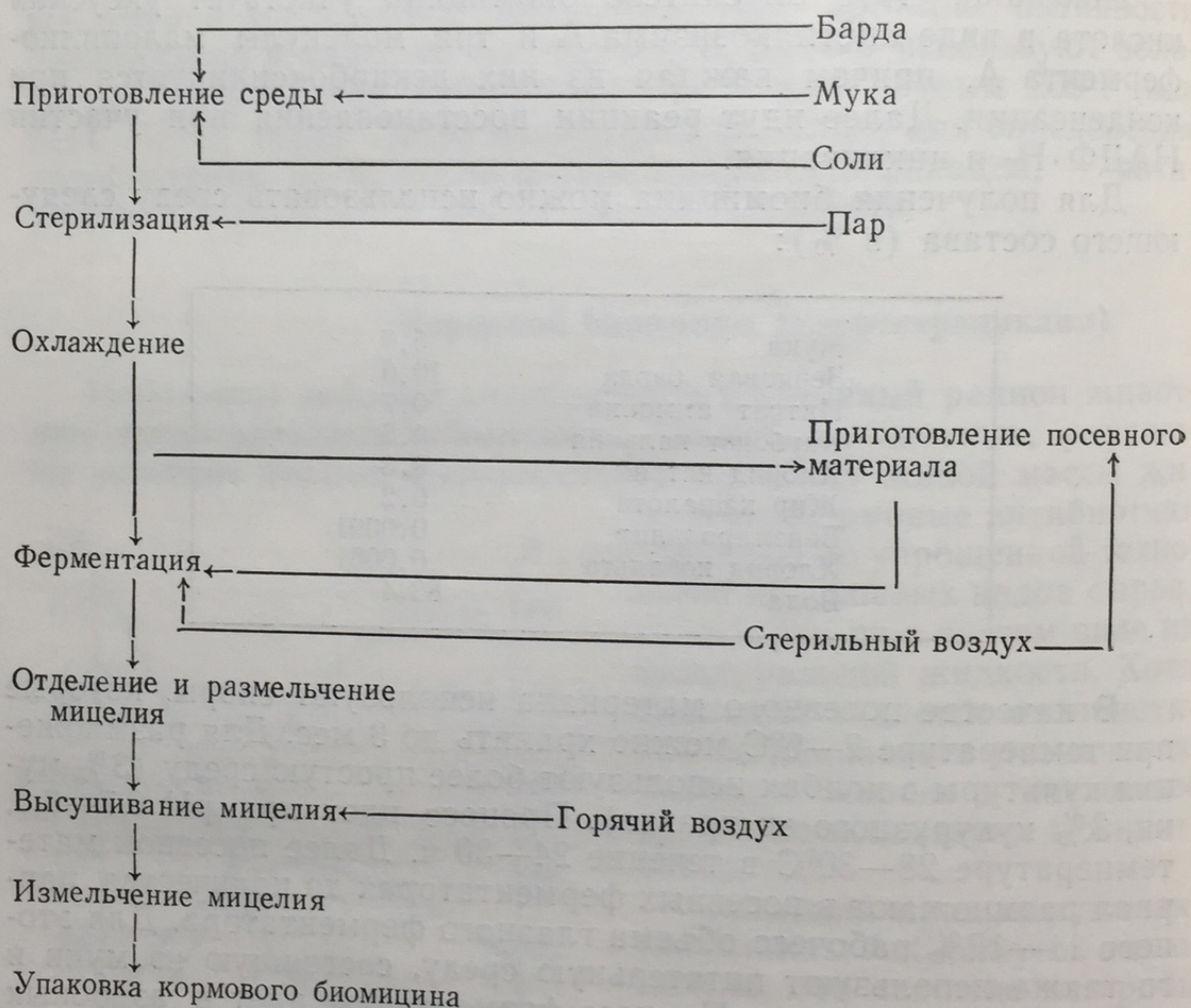
Хранение посевного материала при температуре 16—18°C допустимо только до 20 ч.

Главную ферментацию ведут в аппаратах с мешалками или аэрлифтными воздухораспределительными системами, что обеспечивает снабжение культуры кислородом и перемешивает среду. Используя среду указанного ранее состава и обеспечивая



оптимальные условия температуры, реакции среды, аэрации, уже в первые часы культивирования можно наблюдать интенсивный рост мицелия. В течение первых 16 ч в гифах наблюдается гомогенная протоплазма, а через 24 ч появляется фрагментация протоплазмы; в это время культуральная жидкость приобретает желто-коричневый цвет. На этом этапе интенсивно синтезируется биомидин, при этом рН среды увеличивается и в конце процесса (через 70—80 ч) достигает 7,0—7,2. Во время ферментации активность достигает величины 1000—1500 ед./мл.

Схема получения кормового биомидина приведена ниже.



Одновременно с образованием биомидина *Actinomyces aureofaciens* синтезирует также витамин В<sub>12</sub>. Большая часть биомидина (90%) и В<sub>12</sub> (70%) находится в мицелии. Для получения кормового концентрата мицелий отделяют фильтрацией на вакуум-фильтрах или рамочных фильтр-прессах. Затем пасту гранули-



руют и сушат, используя главным образом сушилки в виде сетчатой ленты типа ПКС. Инактивация биомидина начинается при температуре 60—65°C, поэтому температура воздуха над верхней лентой поддерживается в пределах 75—80°C, а под нижней лентой — в пределах 40—45°C. Мицелий высушивают до 8—9%-ной влажности, затем размельчают в микромельницах и фасуют в бумажные мешки.

В зависимости от активности культуры и режима ферментации 1 кг сухого препарата содержит 50—150 г хлортетрациклина. По требованиям технических условий ТУ активность препарата должна быть 80 г/кг. Этого достигают путем стандартизации, смешивая препараты различной активности или вводя специальные наполнители. Необходимое количество наполнителя для стандартизации 100 кг нативного препарата можно определить по формуле

$$X_0 = \frac{100 (A_n - A_s)}{A_s - A_0},$$

где  $X_0$  — количество наполнителя, кг;

$A_n$  — активность нативного препарата, г/кг;

$A_0$  — активность материала, используемого для стандартизации, г/кг;

$A_s$  — активность стандартного препарата, г/кг.

Препарат сухого биомидина содержит также 7—12 мкг/г витамина  $B_{12}$ .

Используя антибиотики в животноводстве и пищевой промышленности, необходимо следить за тем, чтобы для этих целей не использовались антибиотики медицинского назначения, способные вызвать образование резистентных форм болезнетворных микроорганизмов.

### ПОЛУЧЕНИЕ ФЕРМЕНТНЫХ ПРЕПАРАТОВ

Для получения ферментных препаратов используют как микроскопические грибы, так и бактерии и дрожжи. Иногда получение технического ферментного препарата кончается проведением процесса ферментации, например в спиртовой промышленности для осахаривания крахмала используют жидкую культуру *Aspergillus niger*, выращенную глубинным методом культивирования на спиртовой барде с добавками крахмала (1%) и различных солей. Впоследствии ее добавляют в жидком виде в количествах 10—12% к осахариваемому затору. Однако активность ферментов в культуральной жидкости быстро снижается. Поэтому широко практикуют получение сухих технических ферментных препаратов.



## Технические препараты ферментов

Комплексный амилалитический ферментный препарат получают путем выращивания плесневых грибов на твердой питательной среде с последующей сушкой и измельчением полученной массы. Более активный препарат фермента получают путем экстракции такого «грибного солода» с последующим выпариванием и сушкой. Еще более активные ферментные препараты можно выделить из культуральной жидкости путем осаждения амилазы ацетоном и дальнейшим высушиванием коагулята при температуре 27—28°C. Для осаждения фермента часто используют и сульфат аммония. Предварительно культуральную жидкость выпаривают при температуре 40°C до 40%-ного содержания сухих веществ. Коагулят сушат вместе с наполнителем. В Японии для пищевых нужд используют технический препарат амилазы, полученный адсорбцией фермента из культуральной жидкости особо обработанным крахмалом. Затем амилазу вместе с крахмалом лиофилизируют.

Препарат, содержащий пектиназу, получают из отходов производства лимонной кислоты — мицелия *Aspergillus niger*, высушивая его или коагулируя из экстракта белковую фракцию мицелия. Этот препарат используют для осветления соков и увеличения их выхода при обработке ягод и фруктов.

**Грибной солод.** В последние годы в Советском Союзе широко используют сухие амилалитические ферменты для нужд спиртовой и пивоваренной промышленности и животноводства. Этот препарат часто называют «грибным солодом»\*. Для получения грибного солода чистую культуру размножают в колбах, а затем в кюветах. На этих стадиях питательную среду готовят из стерильных пшеничных отрубей (автоклавирование в течение часа при давлении 0,1 МПа). Влажность отрубей доводят до 45% и подкисляют их соляной или серной кислотой. После охлаждения на влажные отруби засевают чистую культуру и выращивают ее при температуре 30°C в течение 3—4 сут до стадии интенсивного образования спор. В кюветах чистую культуру выращивают 10—12 ч при температуре 32—33°C, а затем при 27—28°C до массовый споруляции. Для лучшего сохранения чистой культуры ее там же в кюветах высушивают до содержания влажности 20—25%, пропуская через кюветы стерильный воздух, нагретый до 40°C. Такую культуру можно хранить до 2 нед. Чистая культура нужна для дальнейшего процесса в количестве 0,3% обрабатываемого объема отрубей.

\* В качестве продуцента амилазы применяют *Aspergillus awamori* или другую культуру рода *Aspergillus*

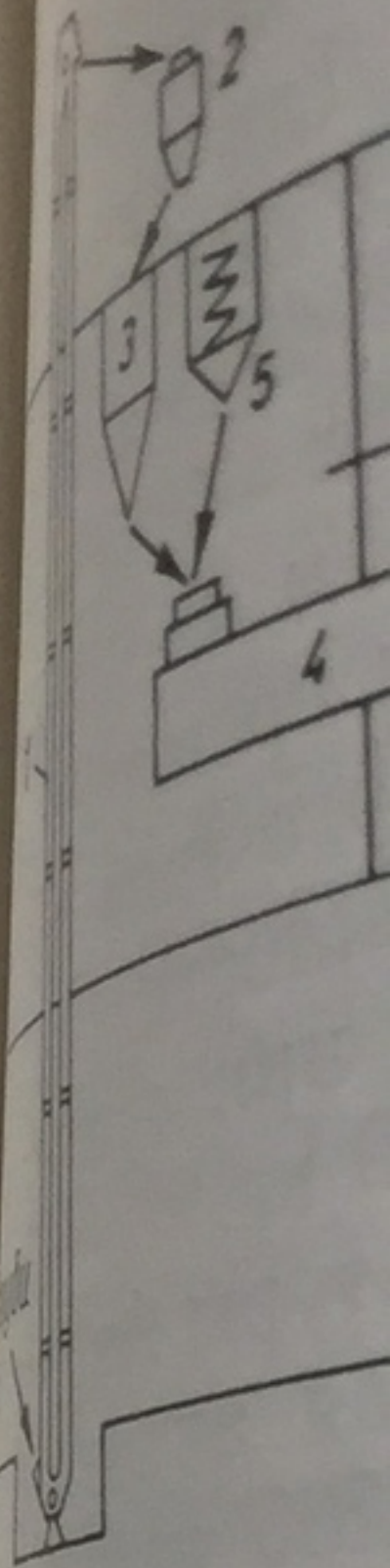


Рис. 65. Схема получения культурального продукта. 1 - резервуар, 2 - автоматический дозатор воды, 6 - измельчитель, 11 - дефибратор, 17 - вентиляторы.

Технология получения культурального продукта. В резервуар (1) загружают пшеничные отруби, которые увлажняют и подкисляют. Затем вводят культуру грибов. Для лучшего развития грибов отруби измельчают (6) и пропускают через дефибратор (11). Вентиляторы (17) обеспечивают циркуляцию воздуха. Выращивают культуру в течение 10—12 часов при температуре 32—33°C, а затем сушат при 27—28°C до влажности 20—25%. Полученный культуральный продукт используют для приготовления ферментных препаратов.



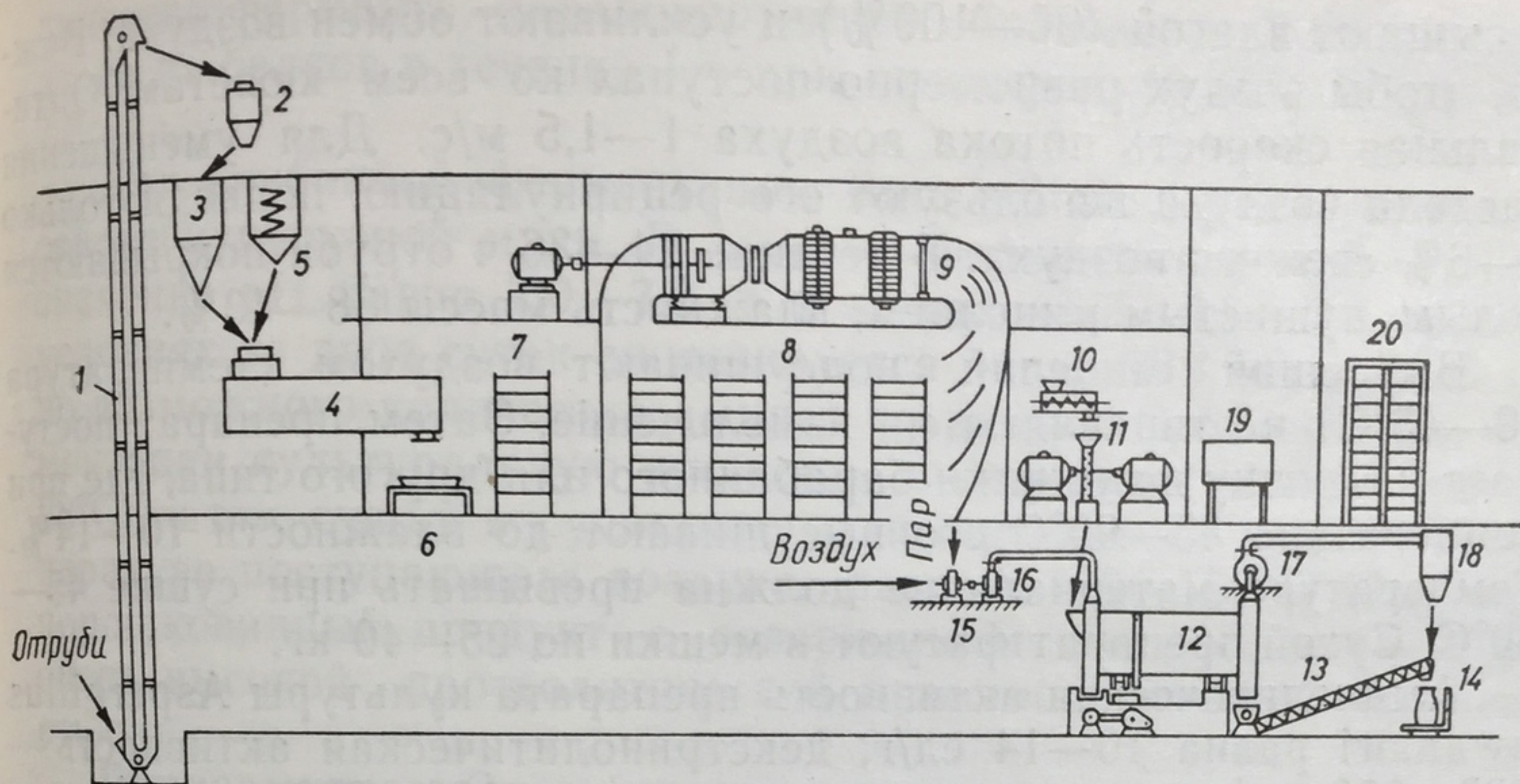


Рис. 65. Схема получения технических ферментных препаратов методом поверхностного культивирования:

1 — элеватор, 2 — автоматические весы, 3 — бункер, 4 — стерилизатор, 5 — резервуар для стерильной воды, 6 — пульт распределения, 7 — полки, 8 — камера, 9 — кондиционер, 10 — дробилка, 11 — дезинтегратор, 12 — сушилка, 13 — шнек, 14 — весы, 15 — калорифер, 16 и 17 — вентиляторы, 18 — циклон, 19 — мойка для кювет, 20 — стерилизатор кювет

Технология получения ферментного препарата методом поверхностного культивирования показана на рис. 65. Для стерилизации отрубей, используемых в главной ферментации, применяют специальные аппараты стерилизации с мешалками, притоком пара и охлаждающими устройствами. Для охлаждения отрубей используется стерильный воздух. Вначале через люк в аппарат вводят отруби, затем постепенно добавляют 0,2% формалина (от количества отрубей), предварительно разбавленного водой. Затем при работе мешалок подводят пар и стерилизуют отруби 50—60 мин при 100—105°C. Затем следует охлаждение отрубей 50—60 мин при 100—105°C. Затем следует охлаждение водой через рубашку аппарата и воздухом до температуры 37°C. Влажность массы доводят до 56—58% охлажденной кипяченой водой, добавляют чистую культуру и хорошо перемешивают. Таковой массой заполняют кюветы и помещают их на специальные полки. Размеры кювет 0,5 м<sup>2</sup>, высота бокового борта 25 мм. Кюветы сделаны из перфорированной жести, размеры отверстий 1,5×20 мм. Перед загрузкой камеры кюветами ее и подсобное помещение стерилизуют 8 ч паром и формалином, затем 3—4 ч проветривают стерильным воздухом.

Выращивание плесневых грибов идет в две стадии. В первые 8—10 ч при температуре 32—33°C, небольшой аэрации и относительной влажности воздуха не менее 92—93% споры набухают и прорастают. На второй стадии образуется богатый амилазой микелий. В этот период температуру снижают до 26—28°C, воздух



насыщают влагой (96—100%) и усиливают обмен воздуха. Важно, чтобы воздух равномерно поступал ко всем кюветам. Оптимальная скорость потока воздуха 1—1,5 м/с. Для уменьшения расхода воздуха используют его рециркуляцию, подводя только 5—6% свежего воздуха. В течение 24—36 ч отруби покрываются белым, пушистым мицелием, влажность массы 38—40%.

Выросший мицелий подсушивают воздухом (температура 40—45°C) и отправляют на измельчение. Затем препарат поступает на сушку в сушилки барабанного или другого типа, где при температуре 85—90°C его высушивают до влажности 10—14%. Температура материала не должна превышать при сушке 45—60°C. Сухой препарат фасуют в мешки по 25—40 кг.

Амилолитическая активность препарата культуры *Aspergillus awamori* равна 10—14 ед/г, декстринолитическая активность — 300—350 ед/г и мальтазная активность — 180—200 ед/г. Единице амилолитической активности (АС) соответствует количество фермента, способное за 1 час при  $t=30^{\circ}\text{C}$  катализировать гидролиз растворимого крахмала до соединений, не дающих реакцию с йодом. За единицу декстринолитической активности (ДС) принимают количество фермента, которое при температуре 50°C и pH 4,5—5,0 за 1 ч способно катализировать образование 1 мг мальтозы из фосфодекстринов. Мальтазная активность (МС) характеризует способность фермента катализировать гидролиз мальтозы до глюкозы. Единице этой активности соответствует количество фермента, катализирующее образование 1 мг глюкозы из мальтозы за 1 ч при температуре 30°C. Для характеристики амилолитической активности используют также осахаривающую способность (ОС). В данном случае за единицу ее принимают количество фермента, способное катализировать гидролиз 1 г растворимого крахмала до мальтозы при температуре 30°C.

**Субтилин.** Комплекс ферментов протеолитического и амилолитического действия получают при помощи культуры *Bacillus subtilis* (см. приложение 4). Это аэробные, грамположительные, подвижные, образующие эндоспоры палочки. Для этих бактерий характерен очень богатый комплекс гидролитических ферментов. В качестве источников питания они могут использовать белки, углеводы, спирты, органические кислоты. *Bac. subtilis* культивируют как методом поверхностного культивирования на отрубях, так и в жидких средах особого состава по методу глубинного культивирования.

При поверхностном методе выращивания культуры процесс длится 2—3 сут при 30 или 37°C. В этом случае амилолитическая активность (АС) сухого препарата *Bac. subtilis* должна быть не менее 150 ед./г, а протеолитическая активность — не менее 6 ед./г. Единицу протеолитической активности характеризует ко-



личество фермента, катализирующее образование 1 мг аминного азота из белков в течение 1 ч при температуре 40°C и pH 7,0—7,3.

Для глубинной ферментации *Bac. subtilis* среду готовят на основе кукурузной муки. В начале ферментации оптимальное значение pH равно 7,0—7,8, а в конце — 6,5—6,9. В аэробных условиях за двое суток синтезируется около 90% от максимального возможного количества амилаз и протеаз. По окончании ферментации культуральную жидкость выпаривают в вакууме при 28°C, затем сушат в сушилках распылительного типа при температуре поступающего воздуха, равной 140—150°C. Получают порошковидный продукт с содержанием влажности 4—10% и очень высокой протеолитической и амилалитической активностью.

**Глюкоамилаза.** Этот фермент расщепляет крахмал до глюкозы, поэтому и используется главным образом для производства глюкозы. В Институте микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР разработан метод получения технического и кормового препарата глюкоамилазы с помощью дрожжей *Endomycopsis fibuliger* (см. приложение 6 цветное). Эта культура на среде Ридера, где в качестве источников углерода используется крахмал (0,5—1%) и дрожжевой автолизат (10—25 мл/л) образует клетки длиной 5,5—12 мкм и диаметром 4,8—6,0 мкм. При отсутствии интенсивного перемешивания среды культура образует разветвленный мицелий. Культура хорошо использует соли аммония в качестве источника азота в отличие от нитратов и мочевины, которые плохо ассимилируются клетками. В качестве источников углерода *End. fibuliger* хорошо использует крахмал, мальтозу, лактозу, фруктозу, этанол; слабо — глюкозу, сахарозу, парафины; не использует органические кислоты.

Процесс ферментации заключается в выращивании культуры *Endomycopsis fibuliger* R313 в условиях интенсивной аэрации. Ферментацию ведут на питательной среде, содержащей следующие ингредиенты от общего количества культуральной среды (в % мас.):

Кукурузная мука	2
Кукурузный экстракт	2
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,33
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,15
$\text{CaCl}_2$	0,033

Процесс ферментации ведут при температуре среды 34°C, pH 7,5—8,0 и частоте вращения мешалки 350—520 об/мин. При



этом аэрация ведется непрерывно. Для контроля процесса ферментации пробы отбирают через каждые 3—4 ч роста. Определяют рН среды, глюкоамилазную активность, количество биомассы в г/100 мл глубинной культуры, состояние клеток и отсутствие посторонней микрофлоры — микроскопически. Процесс прекращают при достижении максимальной глюкоамилазной активности.

Показана возможность ведения процесса ферментации в проточном режиме. При работе с *End. fibuliger* по непрерывному методу динамическое равновесие гомогенного хемостата устанавливается при  $D$  от 0,10 до 0,27 ч<sup>-1</sup>. При этом максимальная удельная скорость образования глюкоамилазы наблюдается при  $D=0,2$  ч<sup>-1</sup>, когда  $K_v=5,7$  г О<sub>2</sub>/л в час.

Сравнительная оценка периодической и проточной культуры *End. fibuliger* R 313 показана в табл. 19.

Таблица 19. Некоторые физиологические и экономические показатели при выращивании дрожжей *Endomycopsis fibuliger* R 313 в условиях периодического и непрерывного культивирования

Показатели	Способ культивирования	
	периодический	непрерывный
Удельная скорость роста, ч <sup>-1</sup>	0,16	0,27
Время генерации, ч	4,3	2,6
Биосинтетическая активность, ед./г·ч	0,589	5,700
Продуктивность по биомассе, г/(л·ч)	0,33	5,67
по продукту, ед./(мл·ч)	2,0	12,4

Как видно, в проточном режиме продуктивность культуры по биомассе в 17 раз и по продукту в 6 раз превышает продуктивность периодического процесса. Во время ферментации активность глюкоамилазы увеличивается до 50—80 ед/мл. При определении глюкоамилазной активности (ГА) глюкооксидазным методом за единицу активности принимают такое количество фермента, которое вызывает образование 1 мг глюкозы из растворимого крахмала за 1 ч при температуре 30°C.

Затем глубинная культура поступает в сборники, далее на вакуум-выпарной аппарат, где упаривается примерно в 10 раз по объему при температуре 34—40°C. В концентрат культуральной жидкости вводят наполнитель NaCl в количестве 100% к содержанию сухих веществ в концентрате. Сушку ведут при температуре 130—150°C, на выходе из сушилки — при 60—70°C. Полученный продукт стандартизируется добавлением наполнителей, расфасовывается и упаковывается.



Из культуральной жидкости можно выделить очищенный ферментный препарат глюкоамилазы. В этом случае от глубинной культуры после окончания процесса культивирования отделяют биомассу на сепараторах или барабанном вакуум-филт্রে. Отделенная от биомассы культуральная жидкость поступает в промежуточный сборник и далее на вакуум-выпарной аппарат. Для осаждения используют этиловый спирт концентрацией 96,0—96,5 об. %. Перед осаждением концентрат охлаждают до температуры 5°C. Осаждение проводят четырьмя объемами спирта (концентрация в смеси 77%) в осадителе при постоянном перемешивании или сульфатом аммония при насыщении 0,7.

Полученный осадок высушивают до влажности 8—12% и растирают в порошок на шаровой мельнице.

**Целлюлолитические ферментные препараты.** В некоторых странах производство целлюлаз поверхностным способом налажено уже давно, главным образом с использованием культуры гриба *Trichoderma viride*. Существующие в настоящее время в мировой практике способы получения целлюлаз в глубинной культуре предполагают выращивание микроорганизмов-продуцентов целлюлаз на питательной среде, содержащей в качестве источников углерода, как правило, очищенную целлюлозу, или же содержащие ее природные субстраты. Однако глубинное получение целлюлазы с использованием в качестве основного компонента среды природной целлюлозы, например древесных опилок, сопряжено с рядом технологических трудностей. А использование очищенных целлюлоз для ферментации экономически нецелесообразно. Более рационально использование питательной среды, содержащей растворимый «индуктор». Такой питательной средой может быть побочный продукт молочной промышленности—молочная сыворотка, основным компонентом которой является лактоза. Институтом микробиологии АН БССР и Институтом микробиологии им. А. Кирхенштейна АН ЛатвССР разработана технология получения препаратов целлюлолитических ферментов. Предварительно от молочной сыворотки отделяют белок.

В качестве продуцента может быть использован выделенный в Институте микробиологии АН БССР гриб *Trichoderma lignorum* OM534, позволяющий получить весь комплекс целлюлолитических ферментов (включая  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_x$  компоненты), необходимый для расщепления природных целлюлозосодержащих субстратов. Посевным материалом служит взвесь спор или 1—2-суточный мицелий, вносимый в среду в количестве 5% объема среды. Состав среды следующий: осветленная молочная сыворотка, разбавленная водопроводной водой в 3 раза,  $NaNO_3$  — 0,3%,  $(NH_4)_2SO_4$  — 0,06%,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  — 0,05%. Оптимальная температура культивирования 29°C.



Таблица 20. Влияние аэрации среды на биосинтез целлюлазы в ферментаторах

Аэрация среды — число объемов воздуха на объем среды	Продолжитель- ность фермента- ции, мин	Конечный рН среды	Активность цел- люлазы $C_2$ , ед. на 1 мл культу- ральной жидкости	Содержание РВ в культуральной жидкости, %
0,5	60—66	7,4	1,8	0,20
1,0	60—62	7,6	3,1	0,05
1,5	54—60	7,8	2,0	0,10
2,0	60—62	7,9	1,3	0,05

Как следует из табл. 20, наиболее активно синтез целлюлазы протекал при подаче одного объема воздуха на один объем среды (при частоте вращения мешалки 280 об/мин).

Продолжительность ферментации (время достижения максимальной активности целлюлаз в культуральной жидкости) составляет 60—62 ч.

Характерной особенностью синтеза целлюлазы *T. lignorum* на среде с молочной сывороткой является активное накопление ферментов в культуральной жидкости в интервале 36—54 ч и довольно быстрое падение активности в последующие часы. Максимум накопления целлюлазы в культуральной жидкости совпадает по времени с максимальным потреблением лактозы среды и рН 7,6—7,8. Активность фермента в это время достигает 3,0—3,1  $C_2$  ед./мл; концентрация биомассы 10—12 г/л, содержание белка 1,1 мг/мл и содержание редуцирующих сахаров в культуральной жидкости 0,1 %.

Далее, в течение нескольких часов (в среднем 2—4) происходит повышение рН до 8,0—8,1 и резкое падение активности целлюлазы почти вдвое. Об окончании ферментации можно судить по рН среды 7,8, внешнему виду мицелия — плотный желтого цвета и прозрачной культуральной жидкости. Повышение рН до 8,0 и выше сопровождается началом автолиза мицелия и помутнения культуральной жидкости. Быстрое падение активности целлюлаз в культуральной жидкости через несколько часов после завершения ферментации происходит, по-видимому, из-за действия протеолитических ферментов, образующихся за счет наличия сывороточного белка в среде.

Осаждение целлюлаз из культуральной жидкости можно осуществить ацетоном, изопропанолом и танином с желатином. При использовании ацетона, изопропанола и этанола необходимо добавить три объема осадителя на объем культуральной жидкости. Исходный рН среды 7,6—7,8, температура 10—15°C. Осадок отделяют через 20—30 мин после добавления осадителя.



Высаливание сульфатом аммония необходимо вести при 80% насыщении, исходном рН среды 7,8 и температуре 10—15°C. Длительность формирования осадков 24 ч. Отделяют осадок центрифугированием при 3000—4000 об/мин в течение 10—15 мин. Ферментный осадок лиофильно или под вакуумом сушат при 25—30°C до остаточной влажности 10—12%.

Таблица 21 Эффективность осаждения целлюлаз, полученных на среде с молочной сывороткой, различными осадителями

Осадитель	Количество препарата, г в 1 л культуральной жидкости	Содержание белка в препарате, %	Активность препарата $C_2$ , ед./г	Выход по активности, %
Ацетон	1,5	33	70	10
Изопропанол	1,8—2,3	35—41	140—150	17—20
Этанол	0,9	38	60	8
Сульфат аммония	3,0—3,2	12—25	580	90
Танин с желатином	2,0	80	750—600	50

Примечание. Выход по активности дан в пересчете на белок.

Результаты выделения целлюлаз различными осадителями показаны в табл. 21. Из нее видно, что наиболее высокие показатели по активности и выходу дают препараты, осажденные сульфатом и танином. Оба способа осаждения имеют свои преимущества. Наиболее эффективно осаждение целлюлозы танином и желатином. Однако сульфатосажденный препарат обладает более высокой удельной активностью, лучшие образцы препарата имеют следующие показатели:  $C_1$  — 1000 ед./г,  $C_2$  — 800 ед./г и  $C_x$  — 1500 ед./г (активность целлюлолитических ферментов дана в единицах по Mandels, Weber).

При осаждении целлюлаз вместе с биомассой из культуральной жидкости выход препарата возрастал в среднем в 10 раз, однако активность его снижалась.

Хорошие результаты дает использование сульфат-изопропилового способа выделения целлюлазы из культуральной жидкости. В качестве оптимальных условий выделения целлюлолитических ферментов можно считать следующие: температура 4—15°C, исходный рН культуральной жидкости 7—8, длительность высаливания сульфатом аммония 12—16 ч, концентрация изопропанола 10%. При этом выход фермента по активности достигает 75—80%, а активность полученного ферментного препарата составляет  $C_1$  — 1000;  $C_2$  — 1130 и  $C_x$  — 3900 ед./г. Лучшим методом сушки, обеспечивающим максимальную стабильность препарата является лиофильная или вакуумная сушка при относительно низкой температуре.



## Выделение и очистка ферментов

Ферменты, растворенные в цитоплазме клеток, легко экстрагируются из них водой или разбавленными растворами солей. Затем эти ферменты очищают и отделяют друг от друга, фракционируя сульфатом аммония.

Ферменты, связанные со структурными элементами клеток, можно выделить только после разрушения клеточной оболочки — дезинтеграции. Клетки можно разрушить механически — растирая, замораживая и оттаивая, подвергая действию ультразвука, или же ферментативно, используя специальные ферментные препараты.

Для разрушения клеток биомассу вначале промывают децимолярным раствором сахарозы (рН 7,3), содержащим какой-либо буфер, этилендиаминтетрауксусную кислоту и альбумин. Затем добавляют стеклянные микрошарики и гомогенизируют в дезинтеграторе 1—2 мин при 13000 об/мин. Клеточные стенки и стеклянные микрошарики отделяют центрифугированием.

Если фермент содержится в липопротеидных комплексах, не растворимых в воде, тогда при помощи бутилового спирта в количестве 3—6% объема ферментного раствора из него извлекают липиды. Фермент остается в водном слое, а липиды переходят в слой бутилового спирта.

Концентрирование растворов ферментов достигают, избавляясь прежде всего от балластных белков. Если фермент термостабилен, например рибонуклеаза, то от белков освобождаются нагреванием раствора. Осадок отделяют центрифугированием. Иногда от белков освобождаются денатурируя их кислотами или воздействуя на ферментный раствор хлороформом или смесью хлороформа и спирта при низкой температуре.

После частичного удаления балластных белков для последующего концентрирования ферментов используют фракционирование растворами солей, например, сульфата аммония. В этом случае надо найти такую концентрацию солей, при которой неактивные белки коагулируют, а активный фермент остается в растворе. Осадок отделяют центрифугированием и после лиофилизации надосадочной жидкости получают ферментный препарат.

Для коагуляции белков и очистки фермента используют также органические растворители — ацетон, этиловый спирт, метиловый спирт, диоксан.

Перспективным методом очистки ферментов является селективная, или избирательная, адсорбция, при использовании каолина, трифосфата кальция, гидроокиси алюминия и других адсорбентов, которые небольшими порциями добавляются к фермент-



ному раствору. Таким образом, проводят адсорбцию либо активного фермента, либо балластных белков. Разделение происходит при центрифугировании. Для элюирования фермента из адсорбента используют раствор фосфатного буфера. Если в ферментном растворе много неорганических солей, перед адсорбцией проводят диализ или фильтрацию раствора через сефадекс.

Дальнейшую очистку ферментного препарата, содержащего в небольших количествах примеси белков, сходных по физико-химическим свойствам с ферментом, ведут методом ионообменной хроматографии. Белки в ионообменном процессе взаимодействуют с ионитом и при помощи электростатического взаимодействия связываются с его поверхностью. Для элюирования белков с поверхности ионита используют изменение концентрации при рН пропускаемого через ионит буфера или введение нейтральных солей ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KCl}$ ).

В последнее время для разделения ферментов широко используют иониты на основе целлюлозы.

Для окончательного фракционирования белков используют также электрофорез, в основе которого лежит разделение кислых и основных молекул белков по их заряду в электрическом поле. Ферменты при достаточной степени очистки их раствора можно получить и в кристаллическом виде. Кристаллизацию ферментов проводят из растворов сульфата аммония, спирта или органических растворителей. К концентрированному раствору фермента осторожно по каплям добавляют насыщенный раствор сульфата аммония или спирт до появления едва заметной мути. Затем раствор на несколько дней оставляют на холоде. Выпавшие кристаллы отделяют и ведут перекристаллизацию до тех пор, пока продолжает увеличиваться активность фермента.

Биомасса дрожжей богата коферментом НАД (никотинамид-адениннуклеотид). Препарат НАД, необходимый для работы в биохимических лабораториях, можно получить из экстракта хлебопекарных дрожжей. Экстракцию ведут водой ( $82-85^\circ\text{C}$ ) в присутствии препарата аэросила А-300. Затем фильтрат, охлажденный до температуры  $25-30^\circ\text{C}$ , рН которого  $6,0-6,1$ , пропускают через ионообменные смолы КУ-23 ( $\text{H}^+$ -форма). НАД элюируют  $0,005$  н. соляной кислотой. Полученный элюат еще раз пропускают через колонку с АН-231 ( $\text{Cl}^-$ -форма) и затем элюируют дистиллированной водой. Для дальнейшей очистки полученный раствор НАД пропускают через колонку с КУ-23 ( $\text{H}^+$ -форма) и только после элюирования  $0,1$  н. раствором аммоний-ацетатного буфера (рН  $5,8-5,9$ ) получают раствор, содержащий  $95-99\%$  пиридиновых коферментов, из которых  $62-65\%$  составляет активный кофермент НАД. Выход НАД при такой обработке составляет  $50-60\%$ .



## Иммобилизация ферментов и целых клеток микроорганизмов

В биологических объектах ферменты обычно находятся в фиксированном состоянии на поверхности различных клеточных структур — наиболее часто на мембранах. Благодаря этому ферменты сохраняют свою активность длительное время. В технологии долгое время применялись препараты свободных ферментов; в таком состоянии срок их использования был коротким — один производственный цикл. Достижения молекулярной биологии привели к детальному изучению строения многих ферментов. Раскрыт аминокислотный состав ряда ферментных белков, их пространственная конфигурация, выявлены активные центры, значение различных функциональных групп в проявлении каталитической активности фермента и т. д. Это позволило создать теоретическую базу для производства ферментов пролонгированного действия или, как их называют, иммобилизованных, фиксированных или связанных ферментных препаратов. Сущность иммобилизации ферментов — прикрепление их в активной форме к нерастворимой основе или заключение в полупроницаемую мембранную систему. Прикрепление фермента к носителю осуществляется адсорбционно, химической связью или путем механического включения фермента в органический или неорганический гель (в капсулу и т. п.). При этом допускается прикрепление фермента только за счет функциональных групп, не входящих в активный центр фермента и не участвующих в образовании фермент-субстратного комплекса. Носитель фермента или матрица может иметь вид зернистого материала, волокнистой структуры, пластинчатой поверхности, пленок или тканей, полых волокон, трубочек, капсул и т. д. Имеет значение размер частиц носителя, Важно иметь большую поверхность, поэтому рекомендуются небольшие частицы диаметром 0,1—0,2 мм. Носитель фермента может быть как природное вещество, так и синтетический полимер. Для иммобилизации широко применяют целлюлозу или ее производные — кислотную карбоксиметилцеллюлозу, ацетоэтилцеллюлозу и др. Целлюлоза в воде набухает и ее гидроксильные группы присоединяют определенные участки молекулы фермента. Из синтетических носителей можно назвать карбоксильные или сульфоксильные хлориды в виде полимерных ионообменных смол, диазотированный полиаминостерин, нитратные сополимеры метакриловой кислоты и др.

Процесс иммобилизации фермента можно продемонстрировать на примере связывания глюкоамилазы с носителем ацетилэтилцеллюлозы. Носитель сначала выдерживают сутки в дистиллированной воде для набухания. Затем при перемешивании к



набухшей ацетилцеллюлозе добавляют сначала натрий-ацетатный буфер с рН 5,5, а затем раствор очищенного фермента; после перемешивания к смеси прибавляют поперечно сшивающий агент — глутаровый альдегид. Последний образует амидную связь между аминок группой носителя и карбоксильной группой ферментного белка. Через несколько часов полученный препарат промывают последовательно натрий-ацетатным буфером и раствором хлористого натрия для удаления сорбированного на носителе белка. Имобилизованный таким образом фермент хранят под слоем воды или буфера при 3—5°C.

Ферменты представляется возможным прикрепить к поверхности носителя путем сорбции к ионитам — катионитам (содержащие активные кислотные группы) или к анионитам (содержащим преимущественно основные группы). В качестве сорбентов — носителей ферментов часто используют гель гидроокиси алюминия или фосфата кальция, диатомит, модифицированный крахмал, бентониты, кизельгуры и др. Сорбцию ферментов осуществляют либо в колонках путем пропускания раствора фермента с определенной скоростью через слой ионитов, либо в реакторах, в которых сорбент определенное время перемешивают с раствором фермента. Полученный продукт затем используют как имобилизованный ферментный препарат. Адсорбция фермента к носителю не обеспечивает их длительную стабилизацию. Более длительную стабилизацию обеспечивает ионообменное связывание фермента, например на модифицированных ионообменных целлюлозах.

Широкое распространение в некоторых странах находят различные методы включения фермента в гель. В процессе полимеризации геля молекулы фермента часто связываются, и тогда фермент оказывается заключенным внутри ячеек геля. Размеры пор геля должны быть меньше размера молекул фермента, но они не должны препятствовать доступу субстрата к ферменту. Для имобилизации ферментов и целых клеток микроорганизмов широко используют акриламидный гель.

В настоящее время разработаны методы имобилизации множества ферментов. Некоторые из них приведены в табл. 22. Как видно из таблицы, один и тот же фермент можно имобилизовать несколькими методами. Так, лактатдегидрогеназу можно включить в гель, прикрепив к носителю поперечной сшивкой; аспарагиназу — прикрепить к носителю сорбционным путем или химической (ковалентной) связью и т. д.

В Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР разработан метод включения клеток *Mycobacterium globiformis* в полупроницаемые мембраны из поливинилового спирта. Для имобилизации клеток был приготовлен 10%-ный раствор



Таблица 22 Известные методы иммобилизации некоторых ферментов

Метод иммобилизации	Номер фермента по классификации	Наименование фермента
1	2	3
Адсорбция или ионный обмен	1.11.1.6	Каталаза
	2.7.7	Рибонуклеаза
	3.1.1.8	Холинэстераза
	3.2.1.21	$\beta$ -Глюкозидаза
	3.2.1.26	Инвертаза
	3.4.4.1	Пепсин
	3.4.4.4	Трипсин
	3.5.1.1	Аспарагиназа
	3.5.1.14	Аминоацилаза
Включение фермента в гель (полиакриламидный)	1.1.1.27	Лактатдегидрогеназа
	1.1.3.4	Глюкооксидаза
	1.11.1.7	Пероксидаза
	2.7.1.1.	Гексокиназа
	2.7.7.—	Рибонуклеаза
	3.1.1.8	Холинэстераза
	3.1.3.1	Щелочная фосфатаза
	3.1.3.2	Кислая фосфатаза
	3.2.1.1.	$\alpha$ -Амилаза
	3.2.1.2	$\beta$ -Амилаза
	3.4.4.4	Трипсин
Поперечная пришивка фермента к носителю	4.1.2.13	Альдолаза
	1.1.1.27	Лактатдегидрогеназа
	1.1.3.4	Глюкооксидаза
	1.11.1.7	Пероксидаза
	2.7.7.—	Рибонуклеаза
	3.1.4.5	Дезоксирибонуклеаза
	3.4.4.4	Трипсин
	3.6.1.3	Аденозинтрифосфатаза
Прикрепление фермента к носителю химической (ковалентной) связью азидным методом	4.1.2.13	Альдолаза
	2.7.7.—	Рибонуклеаза
	3.1.1.8	Холинэстераза
	3.1.4.5	Дезоксирибонуклеаза
	3.2.1.26	Инвертаза
	3.4.4.4	Трипсин
	3.5.1.1	Аспарагиназа
	3.6.1.3	Аденозинтрифосфатаза
карбоимидным методом	1.1.3.4	Глюкооксидаза
	1.11.1.7	Пероксидаза
	2.7.7.—	Рибонуклеаза
	3.1.3.1	Щелочная фосфатаза
	3.1.3.2	Кислая фосфатаза
	3.1.4.5	Дезоксирибонуклеаза
	3.4.4.4	Трипсин
	3.5.1.1	Аспарагиназа



Метод иммобилизации	Номер фермента по классификации	Наименование фермента
1	2	3
бромциан-методом	3.1.1.7	Ацетилхолинэстераза
	3.1.1.8	Холинэстераза
методом диазотирования	3.5.1.1	Аспарагиназа
	1.1.3.4	Глюкооксидаза
	1.11.1.6	Каталаза
	1.11.1.7	Пероксидаза
	2.7.7.—	Рибонуклеаза
	3.1.3.1.	Щелочная фосфатаза
	3.2.1.1	$\alpha$ -Амилаза
изотиоцианатным методом	3.4.4.4	Трипсин
	3.2.1.2	$\beta$ -Амилаза
	3.4.4.4	Трипсин

поливинилового спирта в дистиллированной воде. После полного растворения носителя путем подогрева и последующего охлаждения раствора в него вносили водную суспензию клеток, тщательно перемешивали и гомогенную суспензию затем разливали на чашки Петри. Пленку высушивали, измельчали на фрагменты размером 100—200 мм<sup>2</sup>, промывали холодной водой 2 ч и использовали для трансформации гидрокортизона. Через 30 сут хранения высушенной пленки при 4°C активность 1,2-дегидрогеназы снижалась на 40%. Такая же активность фермента была обнаружена через 12 мес хранения.

Любопытно, что через 5 сут хранения иммобилизованные бактериальные клетки, сохранили жизнеспособность, т. е. дали рост на питательной среде.

Иммобилизованные в геле из поливинилового спирта бактериальные клетки помещали в колонку при условии непрерывного потока субстрата, при этом постоянная дегидрогеназная активность сохранялась в течение 8 сут.

Необходимо отметить, что различные препараты иммобилизованных ферментов содержат 1—10% белка, а активность ферментов составляет 10—90% исходной активности растворимого фермента. Срок хранения иммобилизованных ферментов при пониженной температуре 3—12 мес без потери активности. В реакторах и колонках иммобилизованные ферменты используются неделями и месяцами, что безусловно дает очень большой экономический эффект по сравнению с использованием растворимых форм ферментов.



## Глава X

# МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ТРАНСФОРМАЦИЯ ОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ

### ПРИНЦИПЫ ТРАНСФОРМАЦИИ

В последние годы в микробиологических исследованиях, а также в промышленности появился новый способ использования микроорганизмов. С помощью ферментов микроорганизмов представляется возможным изменить отдельные участки в молекулах органических веществ — происходит микробиологическая трансформация веществ. В отличие от процессов биосинтеза и брожения, в которых участвует большое количество ферментов, в микробиологической трансформации обычно работает один определенный фермент, катализирующий окисление, декарбоксилирование, метилирование или какую-либо другую реакцию. Чтобы провести трансформацию какого-либо вещества, вначале размножают культуру соответствующего микроорганизма до количества, равного 5—10% объема трансформируемого раствора. Раствор для трансформации вещества готовят, учитывая, что 1) в нем надо растворить максимально возможное количество трансформируемого вещества (обычно 10—25%) и 2) надо использовать минимальное количество необходимых для развития культуры питательных солей, притом в таком виде, чтобы не было затруднено химическое выделение вещества. Если трансформируемое вещество не растворяется в воде, его предварительно растворяют в нейтральном органическом растворителе и затем, при интенсивном перемешивании, смешивают с основной средой. Трансформацию ведут в стерильных условиях при оптимальном pH, температуры и других условий. Длительность процесса обычно 1—2 сут. После микробиологической трансформации следует химическое выделение вещества из раствора.

Процессы микробиологической трансформации органических соединений можно разделить на следующие группы:

1) реакции окисления: гидроксилирование неактивированного углерода, окисления олефинов, окисление аллильной группы, микробиологическое гидрооксилирование ароматического кольца, окисления ароматических соединений с разрывом кольца,  $\beta$ -окисление жирных кислот, дегидрирование, окисление карбинольной группы в карбонильную и карбоксильную, альдегидной в карбоксильную, метильной в карбоксильную и вторичной карбинольной группы в кетогруппу, дегидрогенизация циклических спиртов, окисление аминогруппы в нитрогруппу, окислительное замещение



аминогруппы на гидроксильную, окисление тиоэфиров до сульфоксидов и сульфонов, введение N-оксидной группы, окисление циклопарафинов до циклокетонов, смешанные типы окисления;

2) реакции восстановления: восстановление альдегидов до первичных спиртов, восстановление кетонов и дикетонов, гидрирование двойных связей, восстановление нитрогруппы, восстановление первичных и вторичных спиртов, трансформация альдегидов в меркаптосоединения, восстановление серусодержащих соединений и др.;

3) декарбоксилирование: декарбоксилирование органических кислот с образованием концевой метильной группы, окислительное декарбоксилирование кетокислот с образованием карбоновых кислот, восстановительное декарбоксилирование кетокислот в спирты, декарбоксилирование аминокислот с образованием аминов и аминокислот, превращение моноаминокислот в спирты и оксикислоты, смешанные типы декарбоксилирования;

4) реакции дезаминирования: аминокислот в карбоновые кислоты, аминокислот в кето- и оксикислоты, амидов в спирты, окислительное дезаминирование аминов в альдегиды и кетоны, аминов до соответствующих карбоновых кислот и смешанные типы дезаминирования;

5) образование гликозидов, например синтез мальтозы из глюкозы дрожжами;

6) гидролиз: омыление эфиров, гидролиз гликозидной связи, гидролиз амидов, гидролиз белков и др.;

7) реакции метилирования;

8) этерификация, в том числе фосфорилирование и ацетилирование;

9) дегидратация;

10) реакции конденсации;

11) аминирование и амидирование;

12) реакции диметоксилирования;

13) нуклеотизация;

14) галогенирование;

15) деметилирование;

16) ассиметризация;

17) рацемизация;

18) изомеризация.

Подбор культур микроорганизмов для микробиологической трансформации определенных соединений по заданному типу реакции осуществляется эмпирическим путем. Однако можно рекомендовать определенные группы микроорганизмов для осуществления необходимых трансформаций, например, для окисления оксигруппы полиолов можно использовать культуры *Acetobacter* и *Acetomonas*, для окисления аминогруппы в нитрогруппу —



*Streptomyces*, для дезаминирования — дрожжи, для гидроксирования стероидов — грибы и т. д.

Существуют специальные альбомы культур, применяемых для микробиологической трансформации.

Технологические методы, применяемые для трансформации органических соединений, можно разделить на группы:

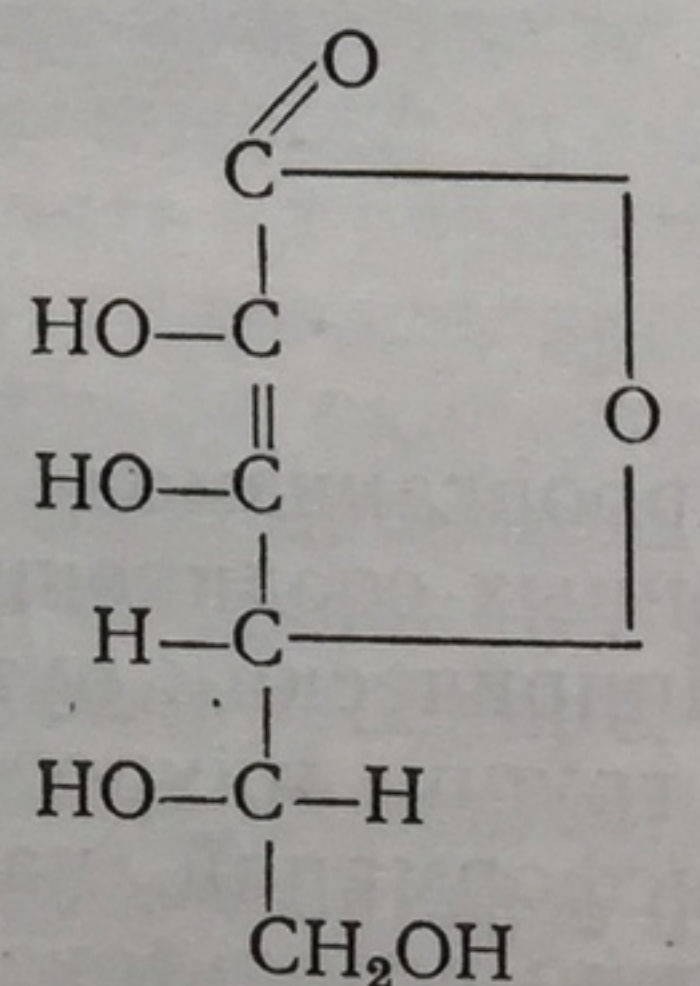
- 1) трансформация в периодических условиях с использованием растущей культуры;
- 2) использование неразмножающихся клеток;
- 3) трансформация спорами;
- 4) применение дезинтегрированных клеток;
- 5) трансформация при помощи иммобилизованных клеток микроорганизмов;
- 6) использование для трансформации выделенных из микроорганизмов ферментных препаратов, в том числе в иммобилизованной форме;
- 7) непрерывные методы.

Микробиологическая трансформация начала интенсивно развиваться после 1934 г., когда было выяснено, что с помощью культуры *Acetobacter suboxydans* из D-сорбита можно получить L-сорбозу, необходимую для синтеза аскорбиновой кислоты.

В СССР научные основы микробиологической трансформации органических соединений разрабатываются в Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР. Этим институтом разработаны технологии многих промышленных процессов, применяемых в основном для получения медикаментов. Ниже приводятся примеры превращения некоторых веществ при использовании трансформирующей способности микроорганизмов.

#### ТРАНСФОРМАЦИЯ D-СОРБИТА В L-СОРБОЗУ

В промышленности аскорбиновую кислоту получают из D-глюкозы, используя комбинированный химико-микробиологический метод.



аскорбиновая кислота  
(витамин С)



Технологический процесс получения аскорбиновой кислоты состоит из пяти стадий:

1) получение D-сорбита из D-глюкозы путем каталитического восстановления последней водородом при давлении 8—12 МПа и температуре 130—135°C;

2) получение L-сорбозы из D-сорбита микробиологической трансформацией при использовании уксуснокислых бактерий;

3) получение диацетон L-сорбозы из сорбозы, обработкой ее ацетоном в присутствии серной кислоты (катализатор). Ацетон затем отгоняют, а диацетонсорбозу выделяют щелочью;

4) окисление диацетонсорбозы перманганатом калия или гипохлоритом натрия в щелочной среде до гидрата диацетон-2-кето-1-гулоновой кислоты, выделение последней при помощи соляной кислоты;

5) енолизация и лактонизация гидрата диацетон-2-кето-1-гулоновой кислоты в аскорбиновую кислоту в присутствии хлороформа или дихлорэтана. Используют в качестве катализатора хлористый водород. Затем аскорбиновую кислоту подвергают перекристаллизации.

Для трансформации D-сорбита в L-сорбозу необходимо провести окислительный процесс, катализаторами которого в биохимической реакции обычно являются дегидрогеназы. Эту реакцию осуществляют культуры многих видов *Acetobacter* — *Ac. xylinum*, *Ac. suboxydans*, *Ac. mesoxydans*, *Ac. melanogenum*, последняя является особо активной.

Окисление сорбита проводят при глубинном ферментировании культуры. Сначала готовят посевной материал в среде, содержащей 10% сорбита и 0,05% (по сухой массе) дрожжевого автолизата. Питательную среду подкисляют до pH 4,5—5,0 уксусной кислотой. Инокуляцию проводят при температуре 30°C в аэробных условиях. После окисления 50% сорбита, посевной материал считают созревшим. Инокуляция длится 12—24 ч.

Основная ферментация — окисление сорбита — происходит в среде, содержащей 20% сорбита и 0,4% (по сухой массе) дрожжевого автолизата. Кислотность среды регулируют уксусной кислотой, так же, как и в среде для посевного материала. В стерильную среду вносят 5—10% (по объему) посевного материала и ведут ферментацию при температуре 32—34°C и интенсивной аэрации — расход воздуха 2—3 л/мин на 1 л питательной среды. Процесс кончают при окислении 95—98% сорбита. В норме процесс длится 15—18 ч. Раствор окисленного сорбита содержит 20—25% сухих веществ. Сорбозу выделяют из раствора, обрабатывая его активированным углем, и затем многократно перекристаллизуя осадок. Конечный продукт — кристаллическую сорбозу — получают влажностью 0,1%.



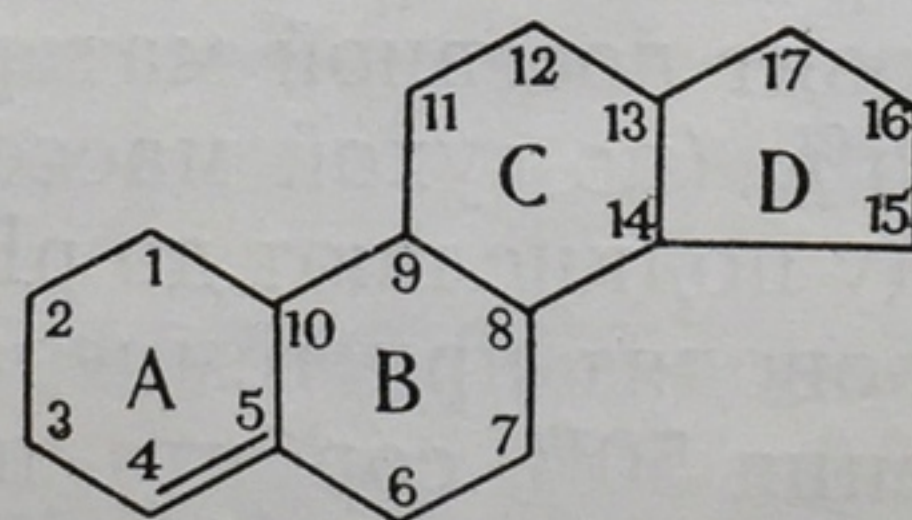
Окисление сорбозы можно интенсифицировать, используя метод добавок. Для этого после окончания процесса ферментации в аппарате оставляют 20—30% раствора, к которому приливают свежую среду. После этого процесс ферментации длится только 12 ч. Таким образом, можно провести десять повторных циклов.

Ферментативную активность *Acetobacter melanogenum* инактивируют тяжелые металлы, особенно никель, который при концентрации 5 мг/л полностью подавляет окислительный процесс. Витамины В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub>, РР активизируют процесс окисления.

Для усовершенствования процесса трансформации сорбита в сорбозу разработана экспериментальная установка для непрерывного процесса. Среду из резервуара непрерывным потоком при помощи насоса подают в стерилизатор, охладитель и затем в смеситель, где в среду вводят культуру. Далее раствор поступает в нижнюю часть ферментатора колоночного типа. В верхней части ферментатора помещается устройство пеногашения и уловитель капель. Содержащая сорбозу культуральная жидкость из верхней части колонны поступает в сборник.

### ТРАНСФОРМАЦИЯ СТЕРОИДОВ

Стероиды очень трудно синтезировать или преобразовывать химическим путем. В их структуру входит циклический компонент — *циклопентанпергидрофенантрен*, отдельные кольца которого принято обозначать буквами (А, В, С, D), а атомы углерода цифрами.



циклопентанпергидрофенантрен

Практическое и теоретическое значение имеет получение и преобразование физиологически активных стероидов, например холестерина, эргостерина, половых гормонов — тестостерона и прогестерона, а также гормонов надпочечников — кортикостерона и его производного — кортизона. Уже указывалось, что эргостерин является провитамином витамина D<sub>2</sub>, кортикостерон используют при лечении шоковых состояний, кортизон — для лечения артрита и различных воспалений, преднизолон — для лечения кожных заболеваний и т. д. Таким образом, физиологически активные стероиды широко применяются в медицине. Для их получения успешно используют метод микробиологической трансформации.



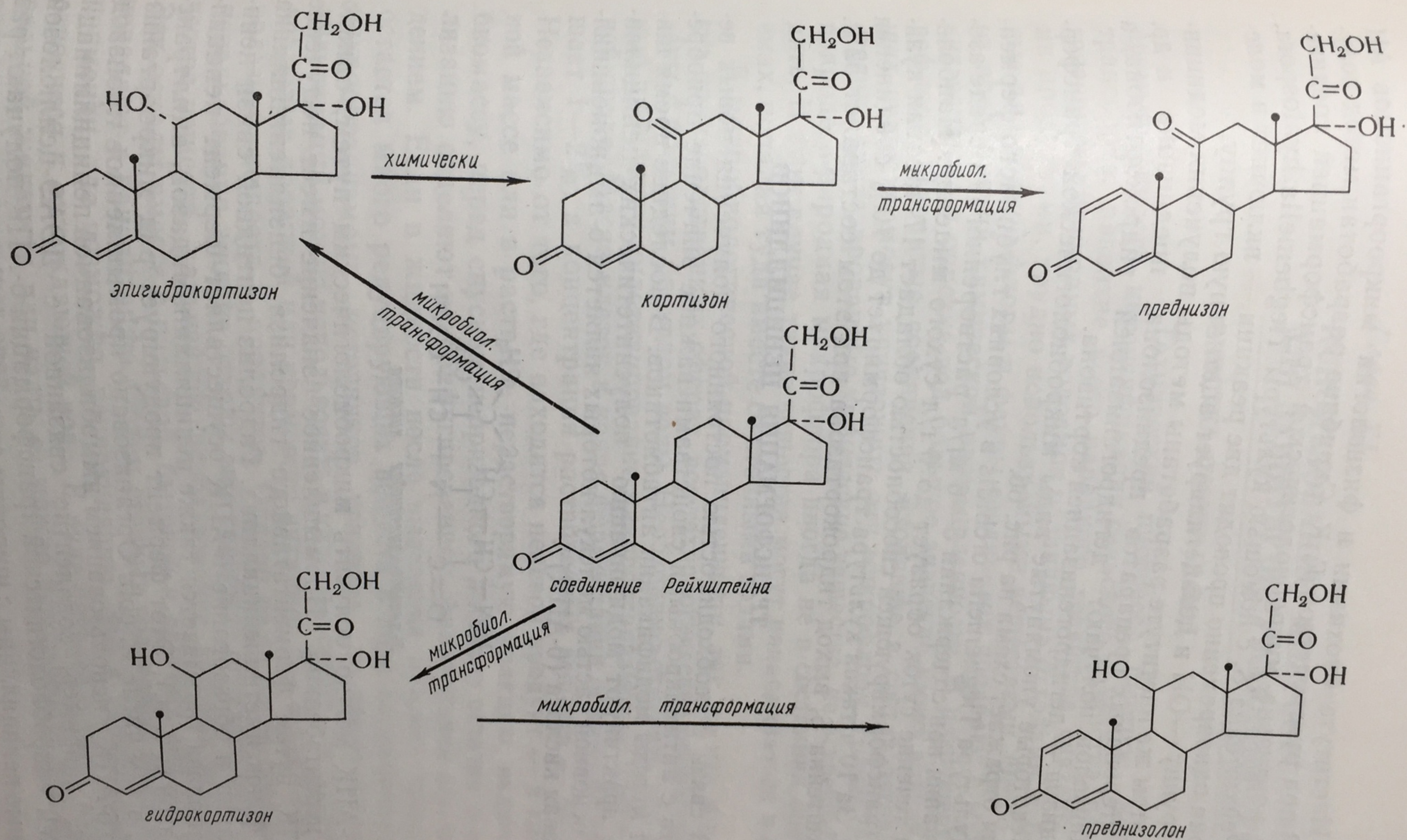


Рис. 66. Схема микробиологической трансформации стероидов



В Институте биохимии и физиологии микроорганизмов АН СССР под руководством Г. К. Скрыбина разработан метод получения кортизона микробиологической трансформацией соединения Рейхштейна S, с помощью культуры *Tieghemella hyalospora*, которая одновременно проводит две реакции — включает в молекулу группу —ОН и деацетилирует ацетильную группу.

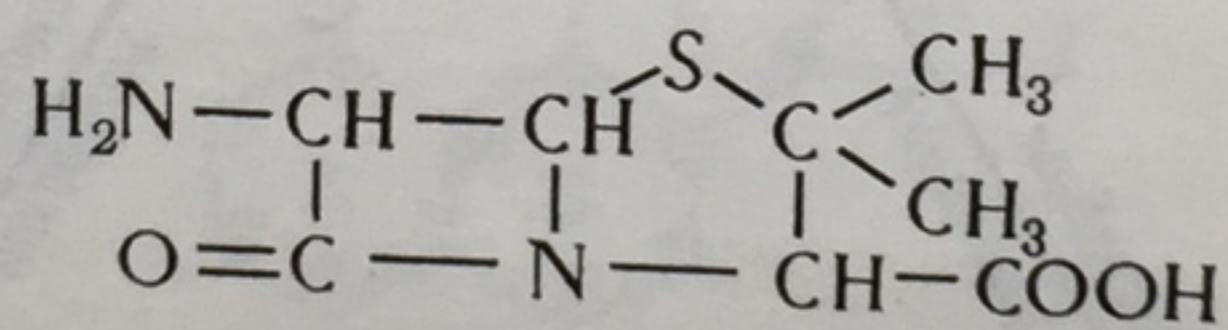
В этом же институте разработаны методы получения медицинских стероидных препаратов преднизолона, преднизона и др. Преднизолон получают дегидрогенизацией гидрокортизона, а преднизон — дегидрогенизацией кортизона.

Некоторые упомянутые виды микробиологической трансформации отражает схема на рис. 66.

Культура *Tieghemella orchidis* в условиях глубинного ферментирования при содержании 5—6 мг/л растворенного в среде азота в течение суток образует до 6 г/л сухого мицелия. Наибольшей трансформирующей способностью обладает 17-часовая культура. За 10 ч такая культура трансформирует до 70% соединения Рейхштейна S, выход гидрокортизона при этом составляет 52%.

### ТРАНСФОРМАЦИЯ ПЕНИЦИЛЛИНОВ

В связи с необходимостью постоянного получения новых веществ с антимикробными свойствами важное значение приобретают методы модификации антибиотиков. В последнее время широко практикуют модификацию полусинтетических пенициллинов, основной частью молекул которых является 6-аминопенициллиновая кислота (6-АПК):



6-аминопенициллиновая кислота

6-АПК можно получить микробиологическим путем, однако это нерентабельно. Промышленное значение имеет получение 6-АПК путем ферментативного гидролиза бензилпенициллина или феноксиметилпенициллина. Гидролиз пептидной связи пенициллина и образование 6-АПК осуществляет фермент пенициллинацилаза (называется также пенициллинамидазой, ацилтрансферазой и т. д.). Этот фермент продуцирует ряд микроорганизмов, в том числе *E. coli*. Организовано промышленное производство 6-АПК с использованием иммобилизованной пенициллинацилазы, например, ковалентно связанной с ДЭАЭ-целлюлозой. Путем микробиологической трансформации 6-АПК получают различные пенициллины с широким спектром биологических свойств.



## Глава XI

# ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МИКРООРГАНИЗМОВ ДЛЯ ЗАЩИТЫ ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЫ

### ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД

Технический прогресс, быстрое развитие промышленности, интенсификация сельского хозяйства, развитие транспорта, развитие всего народного хозяйства связаны с загрязнением природных водоемов различными отходами, побочными продуктами, трудно используемыми веществами. Особо вредные для водной флоры и фауны соединения попадают в водоемы от предприятий химической промышленности. В разрушении таких веществ и очистке вод большое значение имеет водная микрофлора. Ядовитые соединения, входящие в состав загрязняющих веществ, могут уничтожить эту микрофлору. Новые, искусственно синтезированные химические вещества, не встречаемые в природе, природная микрофлора иногда не в состоянии обезвредить. В этом случае такие вещества могут накапливаться в водоемах, попадая туда вместе со сточными водами.

В микробиологической промышленности, так же как и в других производственных сферах, все технологические процессы связаны с большим расходом воды. Необходимо отметить, что главный процесс — культивирование микроорганизмов — идет в водной среде. Масса клеток в конце ферментации обычно не превышает 1—2%, а концентрация растворенных веществ — 5—10%. Независимо от того, где находится целевой продукт — в клеточной массе или в растворе, нерастворимую фракцию, включая и биомассу, перед спуском непригодного жидкого остатка в канализацию отделяют центрифугированием, фильтрацией или осаждением. Если в жидкости после выделения нужных продуктов остается много редуцирующих веществ в виде ассимилируемых микроорганизмами источников углерода, то такую жидкость культивации можно использовать в качестве среды для получения кормовых дрожжей или кормового витамина B<sub>12</sub>, а также других полезных веществ и продуктов. Однако даже после повторного использования жидкие отходы еще содержат определенное количество веществ, дальнейшее использование которых невыгодно. Эти отходы вместе с питьевой, бытовой и другими видами воды попадают в канализацию. Объем сточных вод можно уменьшить, применяя, где возможно, рециркуляцию. Это в первую очередь относится к охлаждающей воде. В ряде случаев остаток культуральной жидкости или часть ее можно использовать для приготовления питательных сред.



В связи с развитием промышленности общий объем сточных вод непрерывно растет. При выбросе этих вод в реки, озера и другие природные водоемы возрастает опасность их загрязнения. Так же как и в природе вообще, и в воде установились определенные взаимоотношения между растениями, животными и микроорганизмами.

В нормальных условиях в воде идет биологическое самоочищение, т. е. воде присуща способность в определенных пределах нейтрализовать различные физические, химические и биологические факторы и восстановить свойства, присущие чистой воде. Как только концентрация вредных веществ в природных водоемах становится выше критической, развитие живых организмов, а также процесс биологического самоочищения нарушается.

Под влиянием чужеродных вредных веществ нарушается установившееся равновесие, появляются нежелательные изменения, способные отрицательно воздействовать на здоровье человека и его хозяйственную деятельность.

В основные группы загрязняющих водоемы веществ входят:

1) различные яды или вредные вещества — соли тяжелых металлов, мышьяк, цианиды, фенолы, анилин, пестициды и другие вещества, ингибирующие активность ферментных систем, связывающие кислород или другим образом нарушающие жизненные процессы;

2) кислоты и щелочи, изменяющие реакцию среды природных водоемов и в результате этого нарушающие равновесие живых систем;

3) поверхностно-активные вещества, которые в последнее время при развитии химической промышленности все чаще попадают в природные водоемы, образуя слой пены на их поверхности. Надо отметить, что эти вещества очень опасны, так как часто по своим химическим свойствам недоступны воздействию микроорганизмов и не разрушаются;

4) растворимые органические вещества, содержащие углерод и азот, используются микроорганизмами в качестве среды и способствуют их чрезмерному размножению в водоемах. Это в свою очередь связано с увеличенным расходом растворенного в воде кислорода и развитием анаэробной, гнилостной микрофлоры, что вызывает вымирание других форм жизни. В данных условиях могут развиваться формы микроорганизмов, опасные для здоровья человека — сульфатредуцирующие бактерии, в результате действия которых появляется неприятный запах (сероводород) и т. д.;

5) нерастворимые органические соединения — крахмал, целлюлоза, лигнин, другие высокомолекулярные вещества, которые в виде плавающих частиц поступают в водоемы и вызывают по-



следствия схожие с действием веществ предыдущей группы. В данном случае эти процессы идут менее интенсивно.

Микробиологические предприятия загрязняют сточные воды, главным образом органическими веществами. Разрушение органических веществ в любом случае связано с потреблением кислорода. Для эффективного контроля степени загрязненности сточных вод широко используют показатель биологического потребления кислорода (БПК), отражающий способность потреблять кислород. Для определения БПК образец сточных вод вместе с содержащейся в нем микрофлорой разбавляют аэрированной водой и помещают в термостат при 20°C. В начале и конце опыта определяют концентрацию растворенного кислорода в образце и затем вычисляют его расход в мг на 1 л загрязненной воды.

Для определения концентрации растворенного кислорода используют метод Винклера, а в последнее время — полярографический метод.

Характеристика сточных вод производства хлебопекарных дрожжей из мелассы представлена в табл. 23.

Таблица 23. Состав производственных сточных вод мелассно-дрожжевых заводов

Показатели	Стоки				
	после первого сепарирования	после второго сепарирования	с фильтров-прессов	осветленные после отстаивания	общий заводской
рН	4,6	5,0	5,4	4,2	5,1
Окисляемость, мг/л	2998—4000	374—525	451—638	1944	520—662
БПК <sub>5</sub> , мг/л	6200	1430—3000	—	3110	1620
Взвешенные вещества при 120°C, мг/л	135,6	—	142—353	1493	326—17601
Взвешенные вещества после прокаливания, мг/л	20,0	—	21—25	1217	64—90
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> , мг/л	79—92	28—35	Следы	587	35—87
Железо, мг/л	45	11,4	9—11	5,1	10—19

Как видно из табл. 23, БПК<sub>5</sub> стоков составляет 1620 мг/л. БПК неочищенных сточных вод производства пенициллина равен 32000 мг/л. В воде чистых рек БПК<sub>5</sub> равен 1 мг/л. Для предотвращения загрязнения природных водоемов БПК<sub>5</sub> сточных вод, спускаемых туда, не должен быть более 20 мг/л. Сточные воды про-



мысленных предприятий перед спуском в природные водоемы необходимо специально обрабатывать.

Если степень загрязнения сточных вод промышленных предприятий превышает допустимый уровень, их необходимо очищать. Очистка сточных вод в микробиологической промышленности — довольно сложная проблема, требующая больших затрат и постоянного контроля (рис. 67).

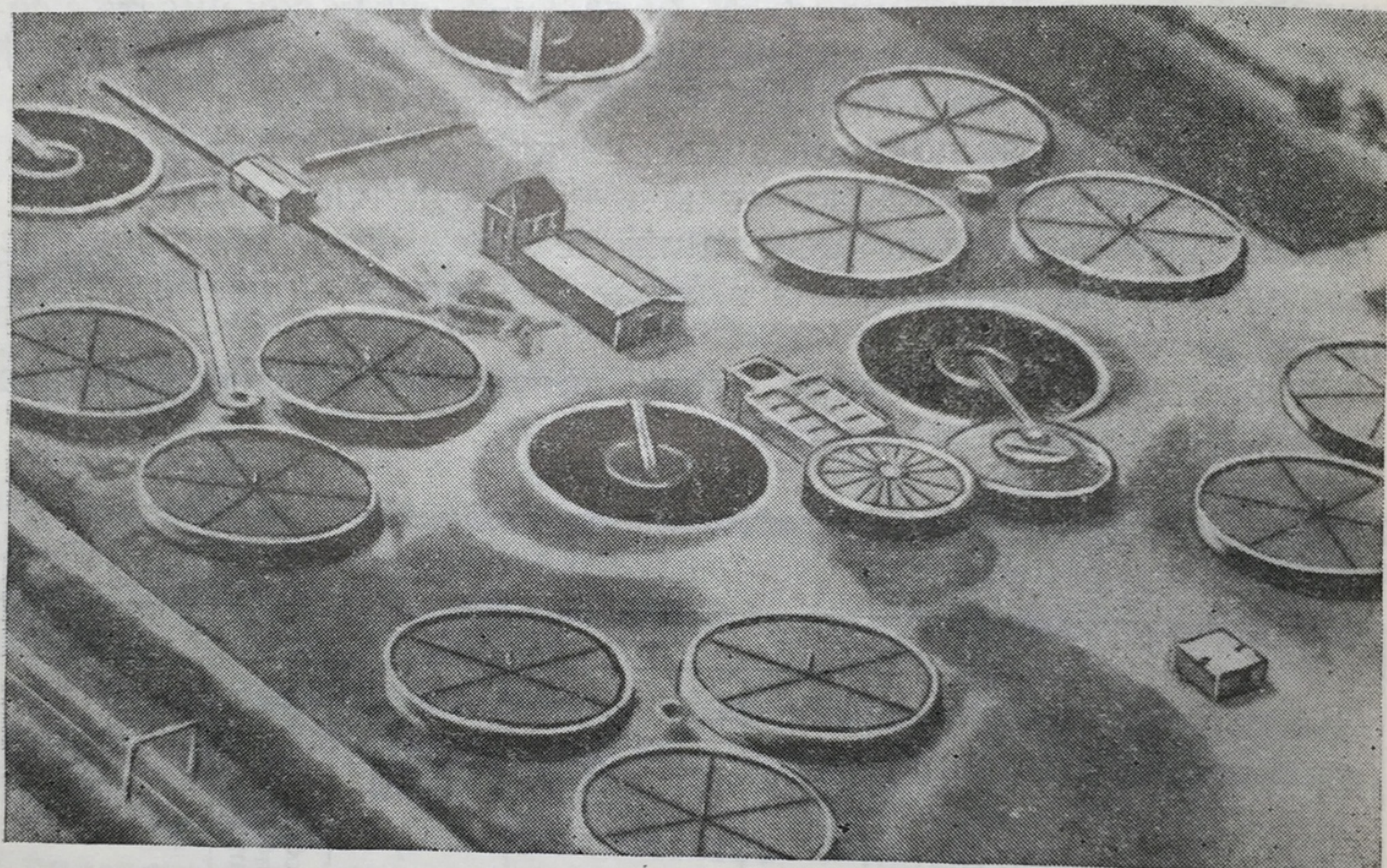


Рис. 67. Общий вид очистного комплекса промышленных сточных вод

В более простых случаях можно использовать сито и биологические фильтры, однако технология очистки сточных вод часто идет через несколько стадий, в основе которых лежит постепенное удаление органических веществ в виде ила.

Оборудование и методы очистки сточных вод определяет характер загрязнения. Твердые, плавающие предметы отделяют ситами; жиры и масла отделяют фильтрацией через специальные фильтры, например через ящики, заполненные сеном. Это можно осуществить в осадительных ямах с досками, расположенными в верхнем слое воды на ребро, перпендикулярно к направлению потока воды так, чтобы половина ширины досок находилась под уровнем воды (рис. 68). В таких ямах удаляют и тяжелые, твердые предметы, оседающие на дно. Чтобы их оседание было полным, размеры ямы должны соответствовать размерам осаждае-

тел и с  
нения ос  
Если во  
протек  
обработ  
стки сто  
лоидны

8600  
↓

Рис. 68.  
1 — доски

или алюм  
роко рас  
обработк  
робной с

Загрязнени  
↓  
Отделение  
отделение

Осадки—  
↓  
Размельче

Частично  
аэробным  
способом  
↓  
Утилизаци  
сжигани  
в качест



мых тел и скорости потока воды. Для обеспечения периодического удаления осадков необходимо устроить резервные ямы.

Если воду рециркулируют или же требуется на время замедлить протекание биологических процессов, сточные воды иногда обрабатывают хлором или хлорной известью. Методы химической очистки сточных вод базируются на регуляции pH и осаждении коллоидных веществ электролитами (чаще всего солями железа

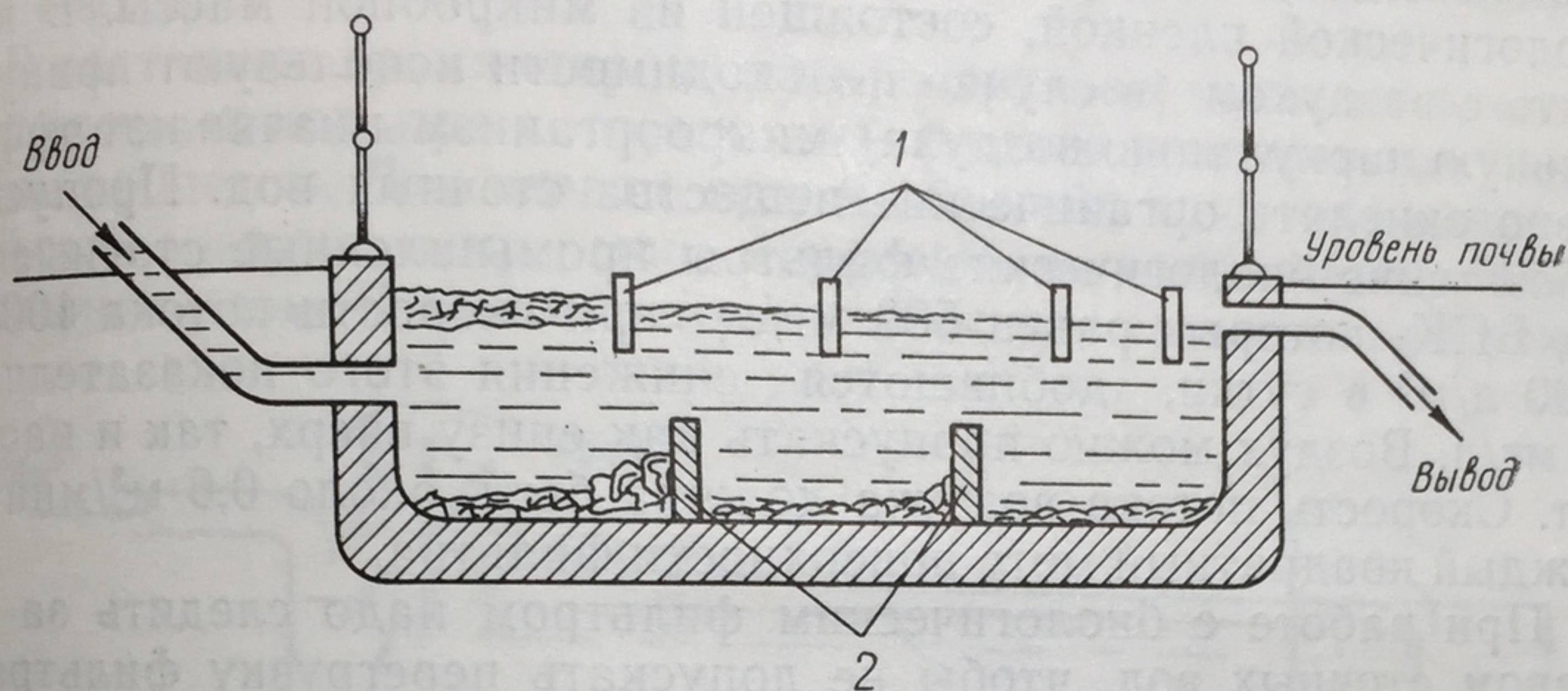


Рис. 68. Отстойник — отделитель жиров:  
1 — доски, 2 — барьеры для задержки осадков

или алюминия). Эти методы обычно комбинируют с другими, широко распространенными биологическими методами очистки — обработкой воды в аэробных условиях активным илом или анаэробной ферментацией.

Загрязненные сточные воды

↓  
Отделение грубых примесей ситами или в осадительных ямах;  
отделение жиров и масел

Осадки

↓  
Размельчение

↓  
Частичное разрушение  
аэробным или анаэробным  
способом

↓  
Утилизация остатков  
сжиганием или использованием  
в качестве удобрения

Субстрат

↓  
Химическое осаждение

↓  
Биологическое разрушение  
органических веществ

↓  
Чистые сточные воды



Если сточные воды не очень загрязнены, для их очистки можно использовать окисление на капельных или биологических фильтрах. Предварительно очищенную от механических примесей и жиров жидкость пропускают через плотный слой каменной щебенки, кокса или крупнозернистого (0,5—5 см) полимерного материала (полистирол или полипропилен) толщиной 0,9—3 м. Через несколько недель поверхность этого слоя покрывается слизистой биологической пленкой, состоящей из микробной массы. В контакте с воздухом (в случае необходимости используют принудительную циркуляцию воздуха) микроорганизмы начинают эффективно окислять органические вещества сточных вод. Пропуская через такие биологические фильтры промышленные сточные воды, БПК<sub>5</sub> которых равен 500 мг/л, при скорости потока 1000—1200 л/м<sup>3</sup> в сутки, добиваются снижения этого показателя до 10 мг/л. Воздух можно пропускать как снизу вверх, так и наоборот. Скорость потока воздуха должна быть около 0,6 м<sup>3</sup>/мин на каждый квадратный метр поверхности фильтра.

При работе с биологическим фильтром надо следить за составом сточных вод, чтобы не допускать перегрузку фильтра и предотвратить уничтожение микрофлоры токсическими соединениями и нерастворенным остатком.

В холодное время года такие системы очистки воды снижают или совсем теряют свою эффективность, так как невозможно существенно образом регулировать температуру воды.

На предприятиях сезонного типа, например сахарных заводах, для аэробной очистки вод используют биологические пруды — систему прудов глубиной 0,6—1,2 м. Они же одновременно служат и водохранилищами. В прудах нельзя допускать протекания анаэробных процессов (гниения). В теплое, солнечное время в них могут развиваться одноклеточные фотосинтезирующие водоросли, весьма благоприятно влияющие на очистку воды. По окончании сезона работ воду спускают, а ил используют для удобрения полей.

Рассмотренные способы очистки сточных вод базируются на микрофлоре для активной переработки загрязнений. Для деятельности микроорганизмов кроме питательных веществ необходим кислород и в небольшом количестве биогенные вещества в виде азот- и фосфорсодержащих веществ.

В биологических фильтрах бактерии в неподвижном состоянии входят в состав слизистой пленки, покрывающей крупнозернистую поверхность наполнителя. Очищаемая вода медленно капает сверху, а в щели между гранулами подается естественным путем или принудительной аэрацией воздух. Мощность биологических фильтров зависит от площади поверхности наполнителя.

В биологических прудах колонии микроорганизмов свободно



перемещаются в воде, кислород поступает через водную поверхность или от фотосинтезирующих водорослей. Кислород естественным образом медленно растворяется в воде. Концентрация микроорганизмов и одноклеточных растений также не может быть слишком высока, так как при этом на дне прудов появляется дополнительный слой осадков, и тогда анаэробные процессы гниения преобладают над аэробными, и происходит вторичное загрязнение воды.

В настоящее время широко распространены такие методы очистки сточных вод, при которых искусственно усиливаются упомянутые процессы. Для этого в водный бассейн вводят большие количества воздуха, непрерывно перемешивая воду вместе с бактериальным илом. К таким методам относится система аэрируемых

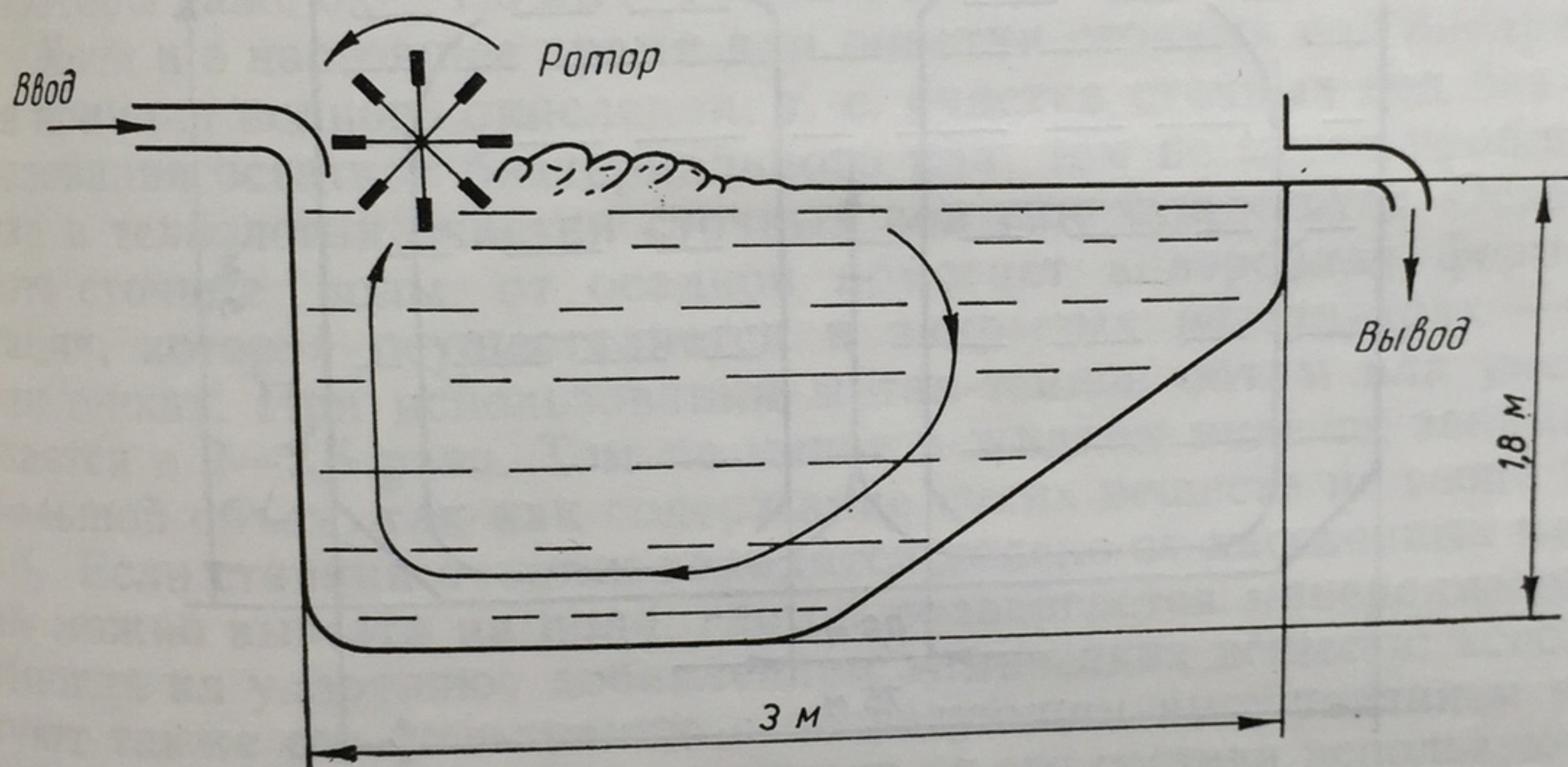


Рис. 69. Аэратор системы Кессенера

прудов, где воздух подают при помощи специальных механических аэраторов, а также метод аэротенков, где водный бассейн представляет собой железобетонный или металлический резервуар, в котором непрерывно перемешиваются сточные воды, микробный ил и воздух. Аэротенки работают в комплексе с отстойниками ила, так как его концентрация во время работы велика.

Разнообразие конструкций аэротенков весьма велико. Их классифицируют по конструкции, по способу соединения аэротенка и отстойника, по системам аэрации, по направлению движения смеси раствор — ил — воздух, по форме и т. д. По числу ступеней аэротенки делят на одноступенчатые и многоступенчатые. Аэротенки классифицируют также по способу регенерации бактериального ила и другим свойствам.

Тип аэротенка выбирают в зависимости от экономических показателей, свойств сточных вод (химический состав, концентра-



ция), занимаемой площади, а также от материала конструкции. Современные аэротенки — это дорогое оборудование по сравнению с аэробными прудами, но они занимают площадь в десятки и даже сотни раз меньше последних, что в промышленных городах, имеет решающее значение.

Основную часть затрат на эксплуатацию аэротенков занимают затраты на аэрацию. Первоначально применялись аэротенки с пневматической аэрацией — при помощи компрессора сжатый

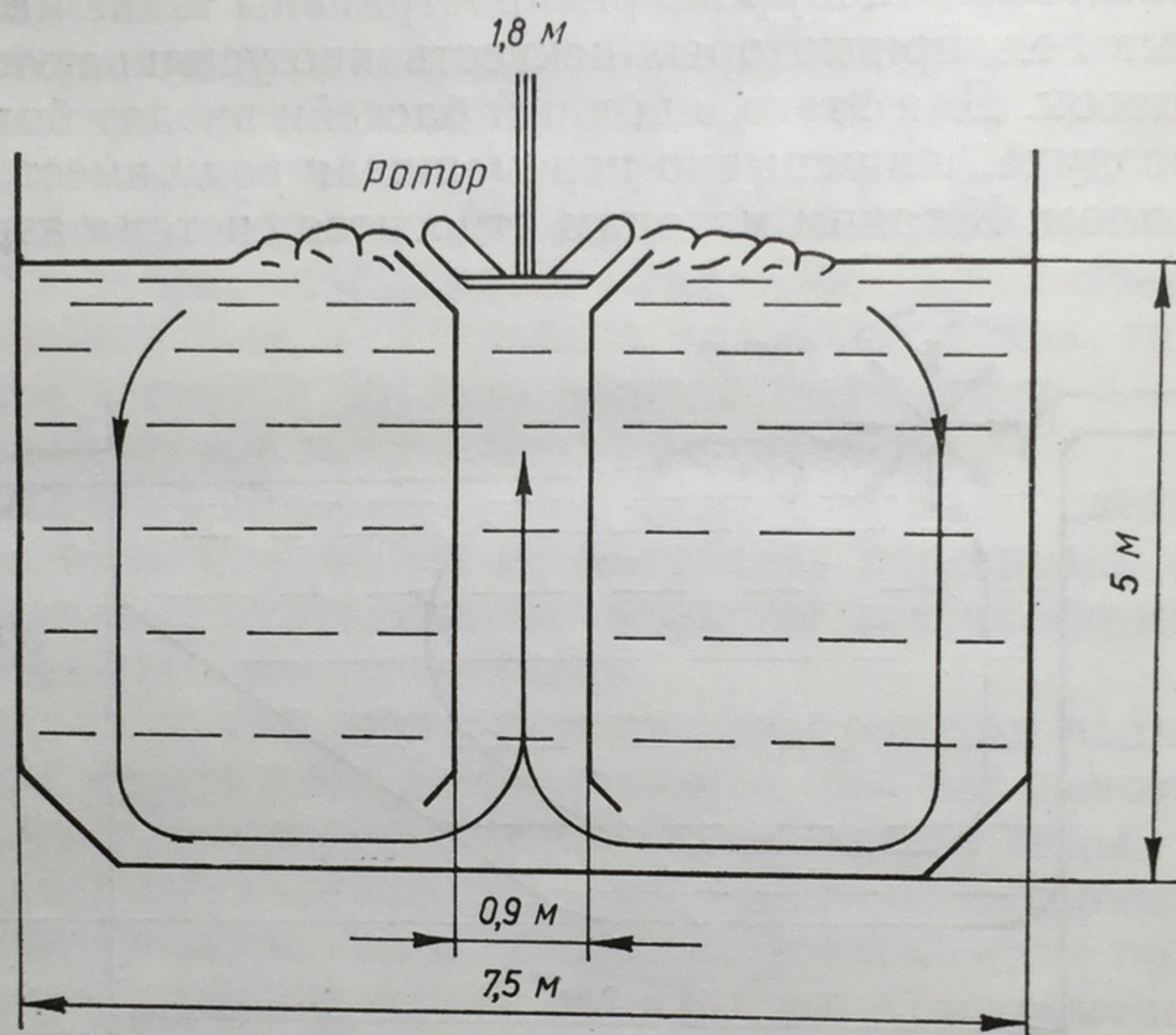


Рис. 70. Конусовидный аэратор

воздух через пористые поверхности подается в нижней части аэротенка. Давно известны также механические поверхностные аэраторы — вращающиеся диски, цилиндрические и лопастные смесители (рис. 69, 70).

Пневматическая аэрация выгодна тем, что компрессор помещается в отдельном помещении, где его легче обслуживать и ремонтировать. В последние годы в связи с повышением надежности электромоторов все более широкое распространение получают механические аэраторы.

В настоящее время на территории Латвийской ССР успешно действуют различные аэротенковые устройства для биологической очистки воды. Система очистки воды Огрского трикотажного комбината гарантирует очистку производственных сточных вод комбината и бытовых сточных вод г. Огре до такой степени, что эти воды можно ввести в водохранилище Рижской ГЭС на Дау-



гаве, откуда планируется брать питьевую воду для Риги. В эту систему очистки входят ловушка песка, флотатор (удаление моющих веществ), аэротенк, вторичный отстойник ила, откуда ил снова подается в аэротенк и узел хлорирования. Поступающая в Даугаву вода содержит 8 мг  $O_2$ /л.

В республике имеется несколько водоочистительных устройств небольшой мощности, представляющих собой видоизмененные системы Кессенера или другие упрощенные типы.

В Институте химии древесины АН ЛатвССР разработан механический аэратор кавитационного типа. Этот аэратор для растворения 1 кг кислорода в воде расходует 0,22—0,25 кВт·ч электроэнергии. Другие типы механических аэраторов для этого расходуют не менее 0,33 кВт·ч электроэнергии, а пневматические аэраторы даже 0,8—1,0 кВт·ч электроэнергии.

Хотя и в настоящее время для очистки сточных вод внедряется принцип полного окисления, т. е. очистка сточных вод без образования остатков бактериального ила, тем не менее проблема ила в технологии очистки сточных вод еще существует. Освободить сточные воды от осадков помогает анаэробная ферментация, которая осуществляется в закрытых резервуарах — метан-тенках. При использовании метан-тенков объем ила уменьшается в 2—2,5 раза. Тем не менее в жидком виде он занимает большой объем, так как содержание сухих веществ не выше 1—5%. Если станции очистки находятся далеко от населенных мест, ил можно вывезти на поля, где он подвергается минерализации. Иногда ил уплотняют добавлением химических веществ; используют также его фильтрацию с последующим высушиванием или сжиганием. Сухой ил в зависимости от его состава используют в качестве кормовой добавки, удобрения или топлива.

#### МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ПЕРЕРАБОТКА НАВОЗА

В связи с концентрацией и специализацией сельскохозяйственного производства создаются крупные животноводческие комплексы, в которых возникает проблема рационального использования навоза. Вывоз больших количеств навоза на поле как органического удобрения трудоемкое дело. Кроме того, с увеличением выпуска минеральных удобрений последние становятся все более рациональной и экономически выгодной формой удобрений. Проблема переработки и использования навоза в крупных животноводческих комплексах связана с решением вопроса об охране окружающей среды от загрязнения. В то же время в нем содержится много неиспользованных животным организмом питательных веществ и микробной биомассы. Крупный рогатый скот выделяет



из организма около 20% непереработанных питательных веществ. Бактериальная биомасса, которая образуется в пищеварительном тракте животных и участвует в процессах расщепления кормов, содержит 50—60% протеина. Все это выделяется из организма и накапливается в навозе. Расчеты специалистов показывают, что в США ежегодно образуется 1,7 млрд. т навоза. Одна треть этого количества навоза содержит столько белка, сколько его дает ежегодный урожай соевых бобов. Известно, что в США соя главный источник кормового белка. Наиболее простой метод переработки навоза в кормовой продукт — стерилизация, промывка и обезвоживание.

В Латвийской ССР имеется положительный опыт по обезвоживанию куриного навоза и его использованию для обогащения рациона свиней.

Более совершенные схемы предусматривают использование микробиологических процессов при утилизации навоза. При этом можно применять предварительный кислотный гидролиз и последующее выращивание кормовых дрожжей. Переработка таким образом свиного навоза от 10000 голов дает в год около 800 т дрожжей. Часть последрожжевой барды используется для кормовых целей.

Один из вариантов — метановое брожение разбавленного водой навоза в анаэробных термофильных условиях. Процесс осуществляется в закрытых резервуарах — метановых танках. Выделяется метан — газ, который используется в качестве горючего. Бактериальную биомассу отделяют центрифугированием или осаждением и обезвоживают (см. получение кормового витамина  $B_{12}$ ). Воду рециркулируют или используют для орошения полей.

Одна из американских корпораций предлагает технологию переработки навоза крупного рогатого скота с использованием микробиологического процесса и получает два продукта кормового назначения. Один из продуктов содержит много клетчатки, белка до 8% и напоминает свежие древесные опилки с запахом силоса. Второй продукт представляет собой тонкодисперсный порошок, содержащий 25—35% белка. Данный технологический процесс переработки навоза заключается в сборе жидкого навоза (около 10 кг от каждой коровы в день) в резервуары, где он выдерживается 3—4 сут. В результате микробиологических процессов утилизируются азотистые соединения. Далее следует разбавление водой и химическая обработка с последующим отделением волокнистых примесей. Из жидкости выделяют богатую белком микробную биомассу, которую обезвоживают и получают вышеупомянутый белковый концентрат, а волокнистые примеси подвергаются силосованию. Один комплекс переработки навоза обслуживает 20 тыс. животных.



Целлюлозосодержащие компоненты навоза можно успешно перерабатывать в белковые кормовые продукты, используя микроскопические грибы. По данным польских ученых, при культивировании грибов на средах, содержащих бесподстилочный навоз, можно получить сухой концентрат с содержанием 14,5% белка. В данном случае процесс ферментации позволил увеличить содержание белка в сухом веществе навоза на 25%.

В ГДР в сельскохозяйственном кооперативе села Тринвиллерсхаген создана установка по двухступенчатой биологической обработке бесподстилочного свиного навоза для комплекса, располагающего 40 тыс. голов.

Бесподстилочный свиной навоз содержит (в % на сырое вещество): сухого вещества 8,1, органических веществ 6,1, общего азота 0,34, аминного азота 0,18, органического азота 0,11, фосфора 0,09, калия 0,39; рН массы составляет 7,1.

Первоначально навоз фракционируют на ситах и в шнековых центрифугах. Твердую фракцию используют для удобрения полей и выращивания шампиньонов, а жидкую — подвергают в дальнейшем биологической обработке сначала в сборном отстойнике емкостью 950 м<sup>3</sup>, а затем в четырех аэротенках емкостью по 52,5 м<sup>3</sup>, оборудованных всасывающими турбинами. Активный ил из аэротенков поступает в отстойник емкостью 750 м<sup>3</sup>, а жидкая фракция направляется в два вторичных отстойника емкостью по 240 м<sup>3</sup>. Все эти емкости металлические. После такой обработки жидкость содержит еще 923 мг/л азота (против 1487 мг/л первоначально) и БПК<sub>5</sub> составляет 427 мг/л (против 4038 мг/л первоначально). В связи с этим перед спуском жидкости в водоемы необходима дальнейшая очистка, что реализуется в биологических прудах, размещенных на 20 га площади неиспользуемых земель.

Так как ил является высокобелковым кормом, специалисты полагают, что реализация высушенного ила может покрывать до 50% расходов по обработке бесподстилочного навоза. Ил выделают в сепараторах (до 10—12% СВ), а затем направляют в распылительные сушилки.

В Чехословакии создан крупный комплекс для откорма 25000 свиней. Бесподстилочный навоз поступает в два метан-тенка емкостью по 3000 м<sup>3</sup> для анаэробного брожения. Туда же, помимо свиного навоза, поступает также активный ил (осадок) из очистительных сооружений города, которые образуют единый комплекс. Весь объем жидкости в метан-тенках при непрерывном режиме работы обменивается за 20 дней. Метановый газ используется на энергетические нужды.

Культуральная жидкость из метан-тенков поступает на пруды и используется для орошения полей.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

- Айба Ш., Хемфри А., Миллис Н. Биохимическая технология и аппаратура. М., «Пищевая промышленность», 1965. 288 с.
- Андреев А. А., Бризгалов Л. И. Производство кормовых дрожжей. Изд. 2-е. М., «Лесная промышленность», 1970. 296 с.
- Басс-Шадхан Х. Ф. Зимозан. Рига, «Зинатне», 1970, 313 с.
- Безбородов А. М. Биосинтез биологически активных веществ микроорганизмами. Л., «Медицина», 1969, 245 с.
- Бекер В. Ф., Бекер М. Е. Лизин микробного синтеза. Рига. «Зинатне», 1974. 124 с.
- Бекер М. Е. Обезвоживание микробной биомассы. Рига, «Зинатне», 1967. 361 с.
- Биосинтез аминокислот микроорганизмами. М., «Наука», 1968. 295 с. Авт.: Е. Л. Рубан, Н. М. Вербина, С. А. Бутенко, Р. К. Озолин, Д. Г. Заринь.
- Бирюзова В. И. Мембранные структуры микроорганизмов. М., «Наука», 1973. 136 с.
- Вилли К., Детье В. Биология. М., «Мир», 1974. 821 с.
- Грачева И. М. Технология ферментных препаратов. М., «Пищевая промышленность», 1975. 392 с.
- Дювинью П., Танг М. Биосфера и место в ней человека. М., «Прогресс», 1968. 268 с.
- Егоров Н. С. Основы учения об антибиотиках. М., «Высшая школа», 1964, 367 с.
- Забродский А. Г. Производство кормовых дрожжей на мелассно-спиртовых заводах. М., «Пищевая промышленность», 1972. 365 с.
- Заварзин Г. А. Литотрофные микроорганизмы. М., «Наука», 1972. 322 с.
- Залашко М. В. Биосинтез липидов дрожжами. Минск, «Наука и техника», 1971. 215 с.
- Иерусалимский Н. Д. Основы физиологии микробов. М., изд. АН СССР, 1963. 242 с.
- Имшенецкий А. А. Микробиология целлюлозы М., изд. АН СССР, 1953. 439 с.
- Карклиньш Р. Я., Пробок А. К. Биосинтез органических кислот. Рига, «Зинатне», 1972. 198 с.
- Квасников Е. И., Нестеренко О. А. Молочнокислые бактерии и пути их использования. М., «Наука», 1975. 389 с.
- Лобанок А. Т., Бабицкая В. Г. Микробиологический синтез белка на целлюлозе. Минск, «Наука и техника», 1976. 229 с.
- Мальцев П. М. Технология солода и пива. М., «Пищевая промышленность», 1964. 858 с.
- Мишустин Е. Н. Микроорганизмы и продуктивность земледелия. М., «Наука», 1972. 342 с.
- Новаковская С. С. Справочник технолога дрожжевого производства. М., «Пищевая промышленность», 1973. 288 с.
- Плевако Е. А. Технология дрожжей. М., «Пищевая промышленность», 1970. 298 с.
- Прескот С., Дэн С. Техническая микробиология. М., ИЛ, 1952, 724 с.
- Производство антибиотиков. Под ред. Навашина С. М., М., «Медицина», 1970. 368 с.



Процессы и аппараты пищевых производств. М., «Пищевая промышленность», 1976. 665 с. Авт.: В. Н. Стабников, В. И. Попов, В. М. Лысянский, Ф. А. Редько.

Роуз Э. Химическая микробиология, М., «Мир», 1971. 294 с.

Скрябин Г. К., Головлева Л. А. Использование микроорганизмов в органическом синтезе. М., «Наука», 1976. 333 с.

Смирнов В. А. Технология гидролизного производства. М., Пищепромиздат, 1948. 362 с.

Уэбб Ф. Биохимическая технология и микробиологический синтез. М., «Медицина», 1969. 560 с.

Уоллен Л., Стодола Ф., Джексон Р. Типовые реакции ферментативной химии. М., ИЛ, 1962. 406 с.

Фремель В. В. Производство кормового биомедицина на спиртовых заводах. М., «Пищевая промышленность», 1966. 295 с.

Фробишер М. Основы микробиологии. М., «Мир», 1965. 680 с.

Федосеев К. Г. Процессы и аппараты биотехнологии в химико-фармацевтической промышленности. М., «Медицина», 1969. 199 с.

Шлегель Г. Общая микробиология. М., «Мир», 1972. 480 с.

Шнайдман Л. О. Производство витаминов. М., Пищепромиздат, 1958. 416 с.

Яровенко В. Л., Калуняц К. А., Голгер Г. И. Производство ферментных препаратов из грибов и бактерий. М., «Пищевая промышленность», 1970. 444 с.



## ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

### А

#### Аминокислоты:

- глутаминовая 168—170
- лизин 50, 159—166
- методы получения 155—158
- натрия глутамат 168—170
- триптофан 166—168

#### Аммиак 85

#### Аммонийные соединения четвертичные 86

#### Аммония сульфат 84

#### Антибиотики:

- биомицин кормовой 190—193
- пенициллин 186—190
- получение 184, 185
- строение 185, 186

#### Антиформин 85

### Б

#### Барда:

- ацетонобутиловая 80, 81
- мелассная 79, 80

#### Белков биосинтез 40—46

#### Биомасса:

- водородных бактерий 121, 122
- кормовая из целлюлозусодержащих субстратов 117—120
- микробная из природного газа 120, 121

### В

#### Вакцины 124—126

#### Вода 75—77

#### Воздухоочистительные системы 92, 93

#### Витамины группы В:

- получение 171, 172
- рибофлавин 172—174
- цианкобаламин 174—180

### Г

#### Гидроль 77

#### Глюкоза кристаллическая 77

#### Гольджи комплекс 18

### Д

#### Диаммонийфосфат 84

#### Дрожжи:

- автолизат 109, 110
- выращивание на этанольной среде 106—109
- кормовые 111—117
- медицинские 122
- получение из мелассы 104—106
- хлебопекарные 103

### Ж

#### Жир кашалотовый 85

### К

#### Калий:

- углекислый кальцинированный 84
- хлористый 84

#### Карбамид 84

#### Каротиноиды 182—184

#### Кислоты неорганические:

- ортофосфорная 83
- серная 83
- соляная 84

#### Кислоты органические:

- глюконовая 152, 153
- итаконовая 153
- кетокислоты 154, 155
- лимонная 147—152
- молочная 145, 146
- олеиновая 84, 85
- пропионовая 146, 147
- уксусная 78, 143—145
- фумаровая 152, 153
- циклические 153, 154

#### Крахмал 77

### Л

#### Лактоза техническая 77

#### Лизина концентрат кормовой 164, 165

#### Липиды 133—135



## М

Магния сульфат 84

Мел 85

Меласса 78, 79

Метаболизм 46—51

Микроорганизмов культивирование:  
выделение продукта из культу-  
ральной жидкости 101, 102  
главная ферментация 100, 101  
методы 67—74

оборудование для приготовления  
питательных сред 86—95  
получение посевного материала  
99, 100

среды питательные 52—56  
стерилизация 56—61, 96, 97

Микроорганизмы:

величина и форма клеток 10—13  
значение в природе 7—10

иммобилизация клеток 204—207  
роль воды в процессах жизнедея-  
тельности 23—27

рост и размножение 61—66, 97—99  
структура клетки 13—21

химический состав клеток 21—23  
хранение культур 97—99

Митохондрии 18, 19

Молочнокислых бактерий закваски  
122—124

Мочевина — см. Карбамид

Мука:

кукурузная 82

соевая 82, 83

## Н

Навоза переработка микробиологиче-  
ская 223—225

Нуклеиновых кислот биосинтез 40—46

## О

Оборудование:

для обработки продуктов фермен-  
тации 93—95

для приготовления питательных  
сред 86—93

## П

Парафин жидкий 77

Пеногасители синтетические 85

Полисахариды:

декстран 136—138

зимозан 135, 136

## Р

Рибосомы 20

## С

Сапропели 83

Сахароза техническая 77

Сода:

кальцинированная 84

каустическая 84

Солодовых ростков вытяжка 82

Спирт этиловый 78, 138—141

Средства защиты растений бактери-  
альные 131—133

Сточных вод очистка 215—223

Сыворотка молочная 82

## Т

Трансформация микробиологическая:

D-сорбита в L-сорбозу 210—212

пенициллинов 214

принципы 208—210

стероидов 212—214

## У

Удобрения бактериальные:

азотобактерин 128, 129

нитрагин 129, 130

фосфобактерин 130

эпифитные стимуляторы 130, 131

## Ф

Ферментаторы 89—92

Ферментов препараты технические:

глюкоамилаза 197—198

солод грибной 194—196

субтилин 196, 197

целлюлолитические 199—201

Ферменты:

важнейшие энергетические про-  
цессы 36—40

выделение и очистка 202, 203

гидролазы 28

изомеразы 28

иммобилизация 204—207

кинетика реакций 32—36

лиазы 28

лигазы 28—32

оксидоредуктазы 28

получение 193

трансферазы 28

Формалин 85

Фотосинтез 7, 8

## Х

Хлортетрациклин — см. Биомицин  
кормовой

## Э

Экстракт кукурузный 81

Эргокальциферол (D<sub>2</sub>) 180—182



## ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие . . . . .	3
Глава I. Микроорганизмы . . . . .	7
Значение микроорганизмов в природе . . . . .	7
Величина и форма клеток . . . . .	10
Структура клетки . . . . .	13
Химический состав клеток . . . . .	21
Роль воды в процессах жизнедеятельности . . . . .	23
Глава II. Обмен веществ и ферментативные процессы . . . . .	27
Ферменты и коферменты . . . . .	27
Кинетика ферментативных реакций . . . . .	32
Важнейшие энергетические процессы . . . . .	36
Биосинтез белков и нуклеиновых кислот . . . . .	40
Принципы регуляции метаболизма . . . . .	46
Глава III. Культивирование микроорганизмов . . . . .	52
Оптимальные условия культивирования . . . . .	52
Рост и размножение . . . . .	61
Методы культивирования . . . . .	67
Глава IV. Основы микробиологического производства . . . . .	75
Сырье . . . . .	75
Технологическое оборудование . . . . .	86
Этапы технологического процесса . . . . .	95
Глава V. Получение микробной биомассы . . . . .	103
Хлебопекарные дрожжи . . . . .	103
Получение дрожжей из мелассы . . . . .	104
Выращивание дрожжей на этанольной среде . . . . .	106
Автолизат дрожжей . . . . .	109
Кормовые дрожжи . . . . .	111
Кормовая биомасса из целлюлозосодержащих субстратов . . . . .	117
Микробная биомасса из природного газа . . . . .	120
Биомасса водородных бактерий . . . . .	121
Медицинские дрожжи . . . . .	122
Закваски молочнокислых бактерий . . . . .	122
Вакцины . . . . .	124
Бактериальные удобрения . . . . .	127
Бактериальные средства защиты растений . . . . .	131
Глава VI. Получение липидов, полисахаридов, этилового спирта и органических растворителей . . . . .	133
Липиды . . . . .	133
Полисахариды . . . . .	135
Зимозан . . . . .	135
Декстран . . . . .	136
Этиловый спирт . . . . .	138
Органические растворители . . . . .	142



Глава VII. Получение органических кислот . . . . .	143
Уксусная кислота и уксус . . . . .	143
Молочная кислота . . . . .	145
Пропионовая кислота . . . . .	146
Лимонная кислота . . . . .	147
Глюконовая кислота . . . . .	152
Фумаровая кислота . . . . .	152
Итаконовая кислота . . . . .	153
Циклические кислоты . . . . .	153
Кетокислоты . . . . .	154
Глава VIII. Получение аминокислот . . . . .	155
Методы получения аминокислот . . . . .	155
Лизин . . . . .	159
Триптофан . . . . .	166
Глутаминовая кислота и глутамат натрия . . . . .	168
Глава IX. Получение витаминов, антибиотиков и ферментных пре- паратов . . . . .	171
Получение витаминов . . . . .	171
Витамины группы В . . . . .	171
Эргокальциферол (D <sub>2</sub> ) . . . . .	180
Каротиноиды . . . . .	182
Получение антибиотиков . . . . .	184
Пенициллин . . . . .	186
Кормовой биомидин (хлортетрациклин) . . . . .	190
Получение ферментных препаратов . . . . .	193
Технические препараты ферментов . . . . .	194
Выделение и очистка ферментов . . . . .	202
Иммобилизация ферментов и целых клеток микроорга- низмов . . . . .	204
Глава X. Микробиологическая трансформация органических соеди- нений . . . . .	208
Принципы трансформации . . . . .	208
Трансформация D-сорбита в L-сорбозу . . . . .	210
Трансформация стероидов . . . . .	212
Трансформация пенициллинов . . . . .	214
Глава XI. Использование микроорганизмов для защиты окружающей среды . . . . .	215
Очистка сточных вод . . . . .	215
Микробиологическая переработка навоза . . . . .	223
Список использованной литературы . . . . .	226
Предметный указатель . . . . .	228



**МАРТИН ЕКАБОВИЧ БЕКЕР**

**ВВЕДЕНИЕ В БИОТЕХНОЛОГИЮ**

Редактор *Л. С. Иванушко*

Художник *М. В. Носов*

Художественный редактор *С. Р. Нак*

Технический редактор *Г. Г. Хацкевич*

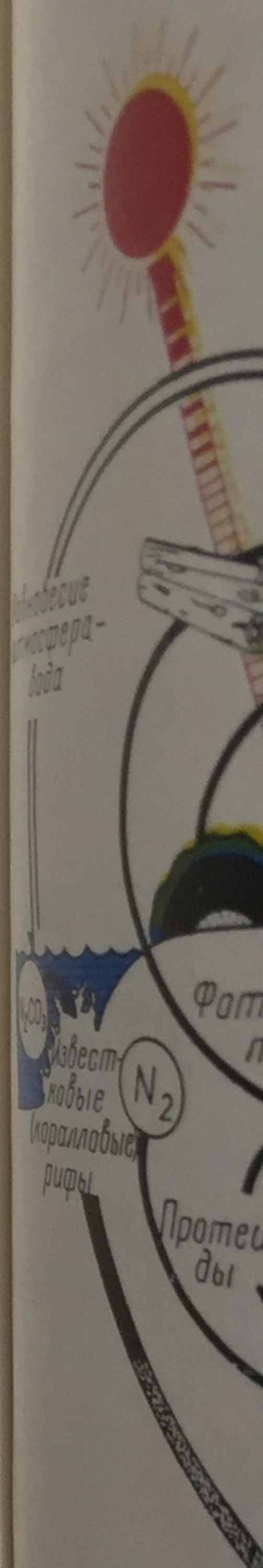
Корректоры *И. М. Авейде, В. Б. Грачева*

ИБ № 699

Сдано в набор 16.06.77. Подписано в печать 28.02.78. Т-03487.  
Формат 60×84<sup>1</sup>/<sub>16</sub>. Бумага типографская № 1. Литературная  
гарнитура. Высокая печать. Объем 14,5 п. л.+1 п. л. вклей-  
ка. Усл. п. л. 14,42. Уч.-изд. л. 14,84. Тираж 3500 экз.  
Заказ 533. Цена 1 р. 20 к.

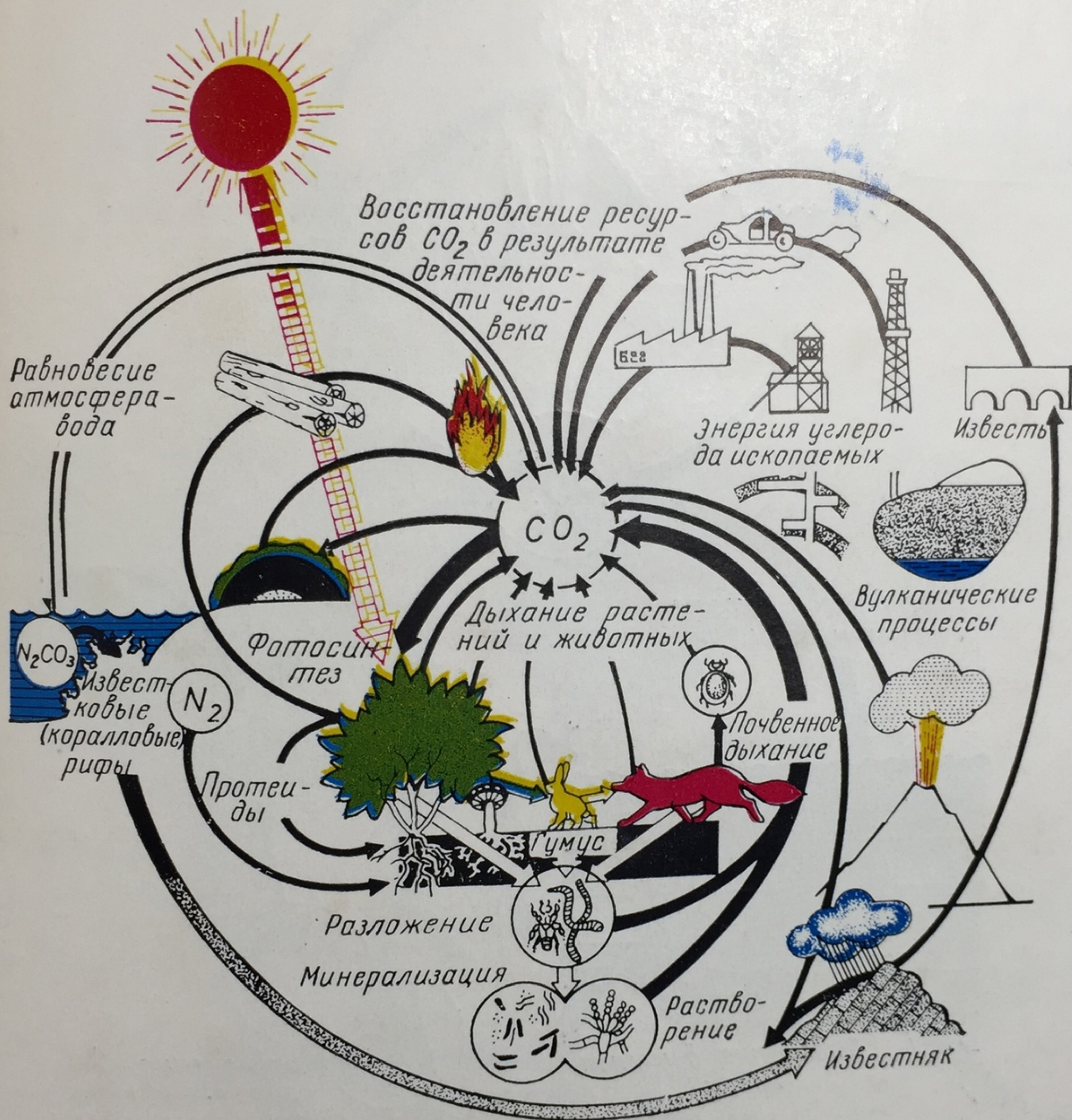
Издательство «Пищевая промышленность»  
113035, Москва, М-35, 1-й Кадашевский пер., д. 12.

Ярославский полиграфкомбинат Союзполиграфпрома при  
Государственном комитете Совета Министров СССР по де-  
лам издательств, полиграфии и книжной торговли. 150014,  
Ярославль, ул. Свободы, 97.



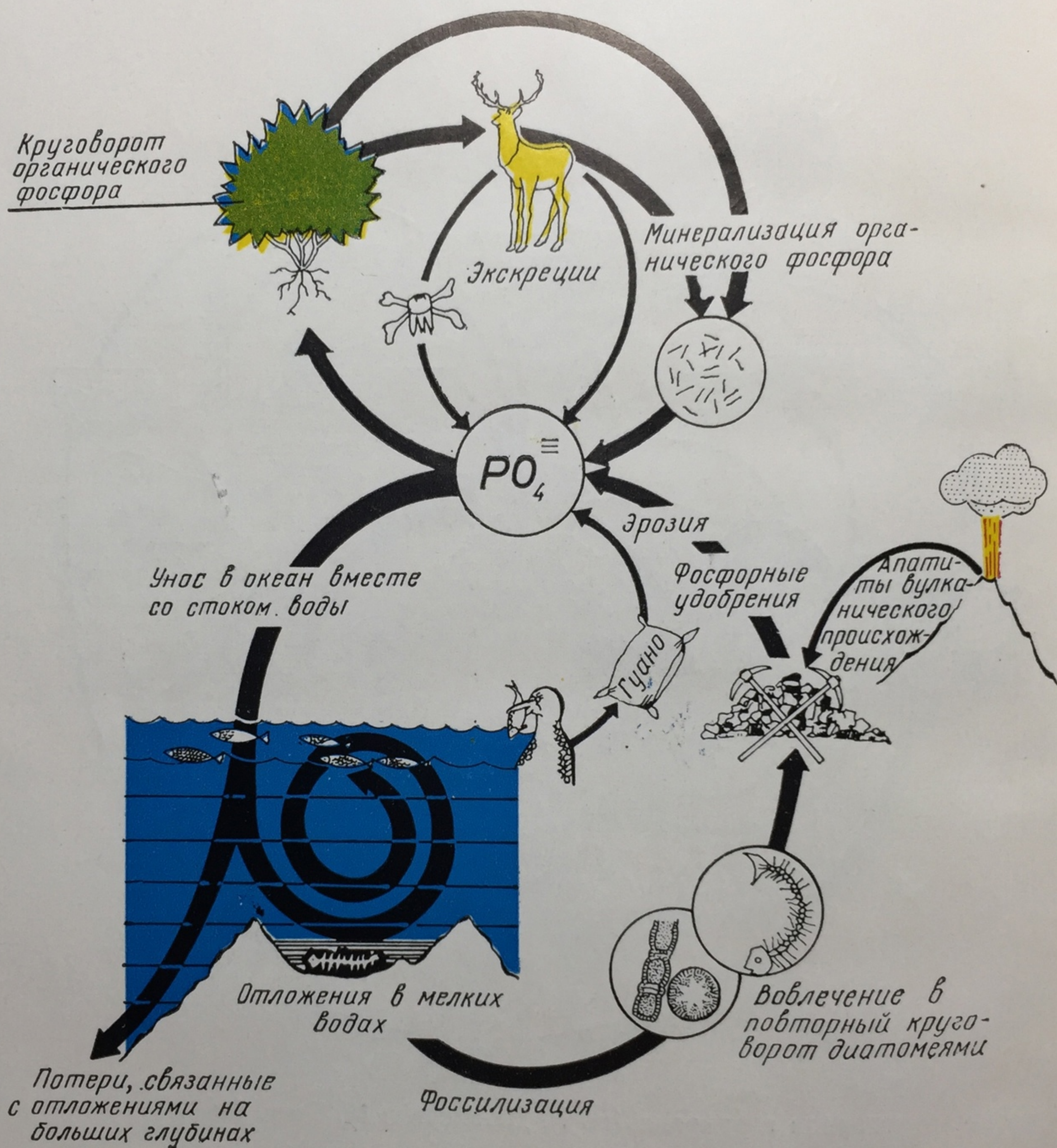
Фотолитография





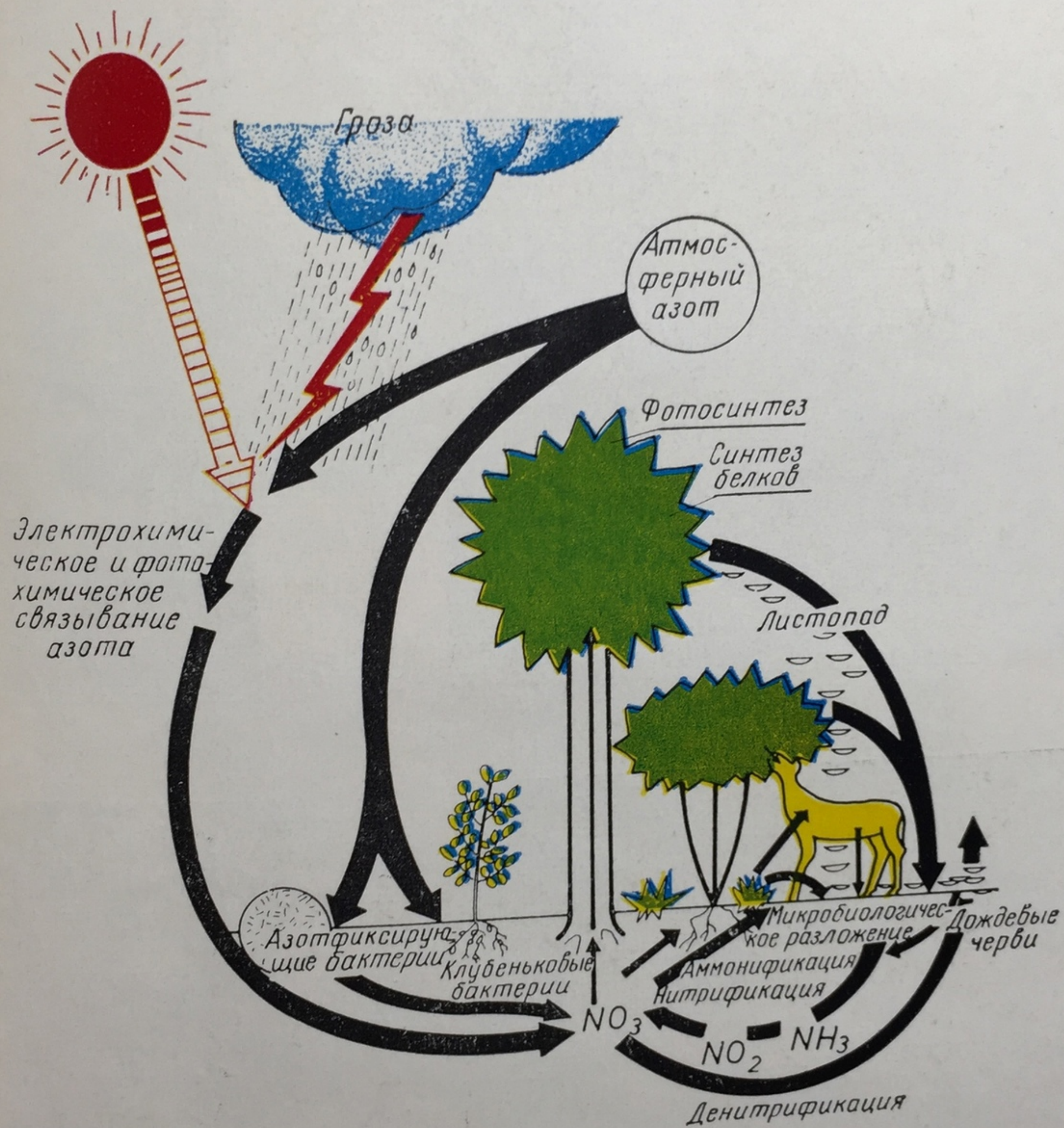
Круговорот углерода в природе (по Р. Дювиньо и М. Танг, 1968)





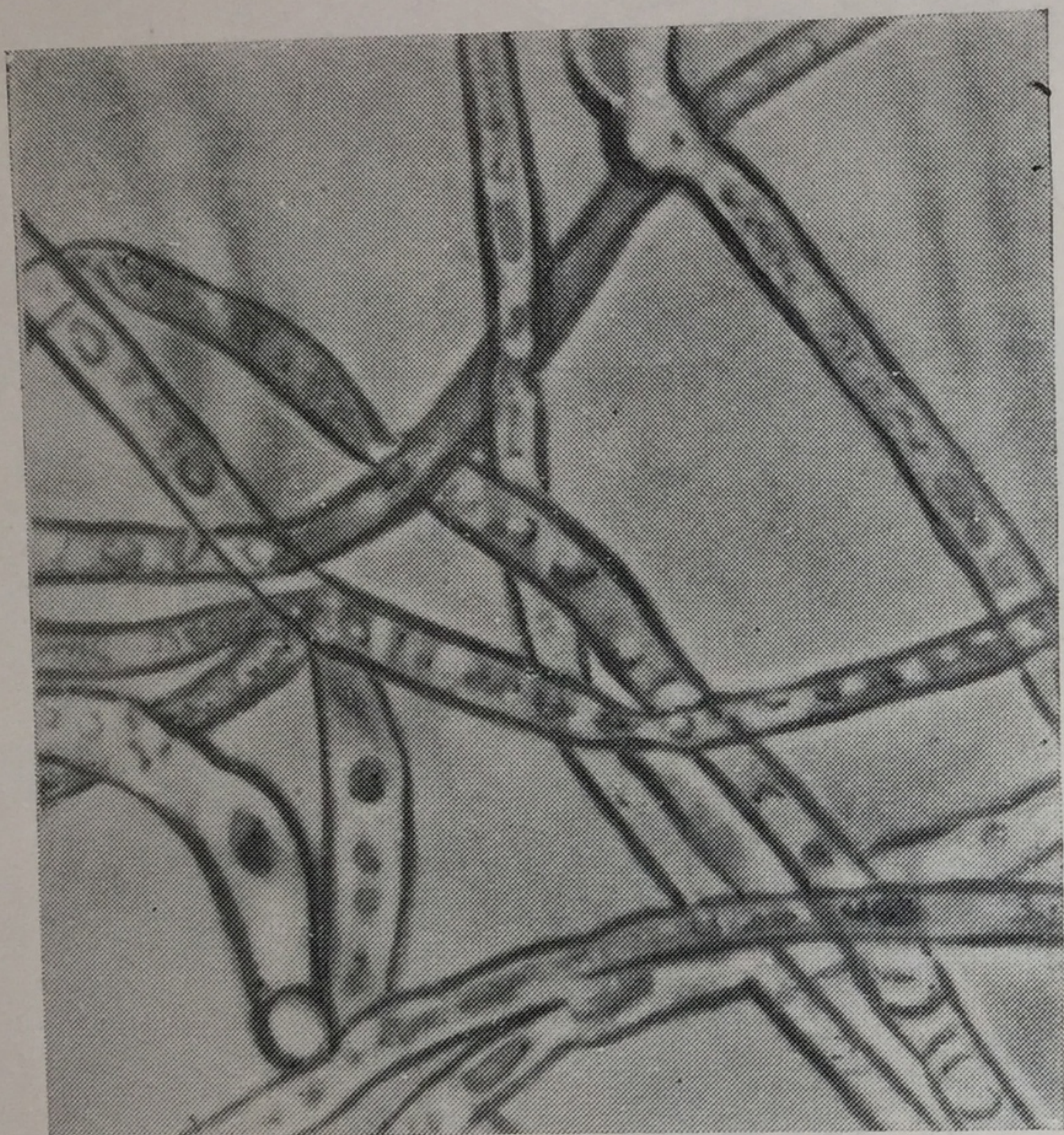
Круговорот фосфора в природе (по Р. Дювиньо и М. Танг, 1968)



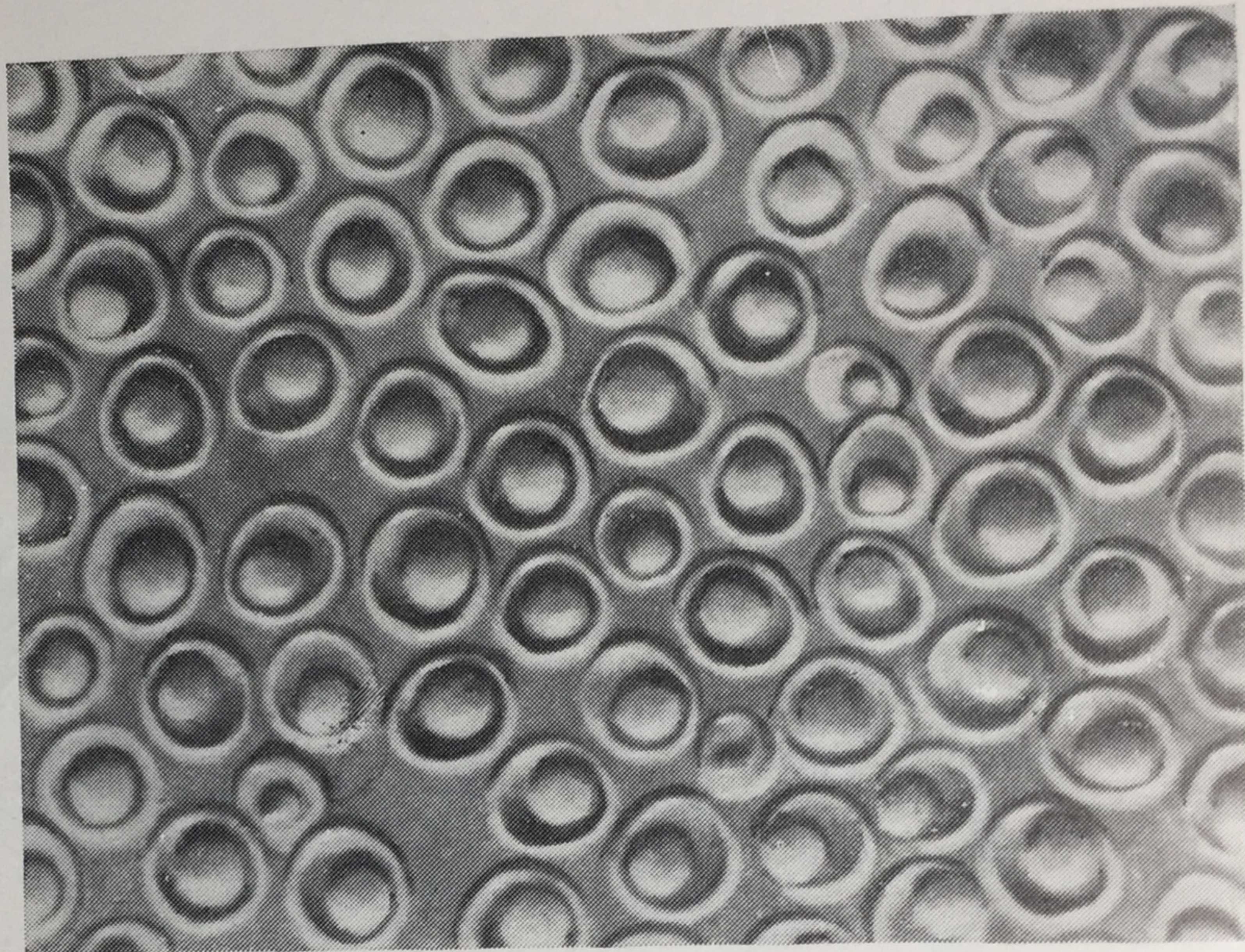


Круговорот азота в природе (по Р. Дювиньо и М. Танг, 1968)

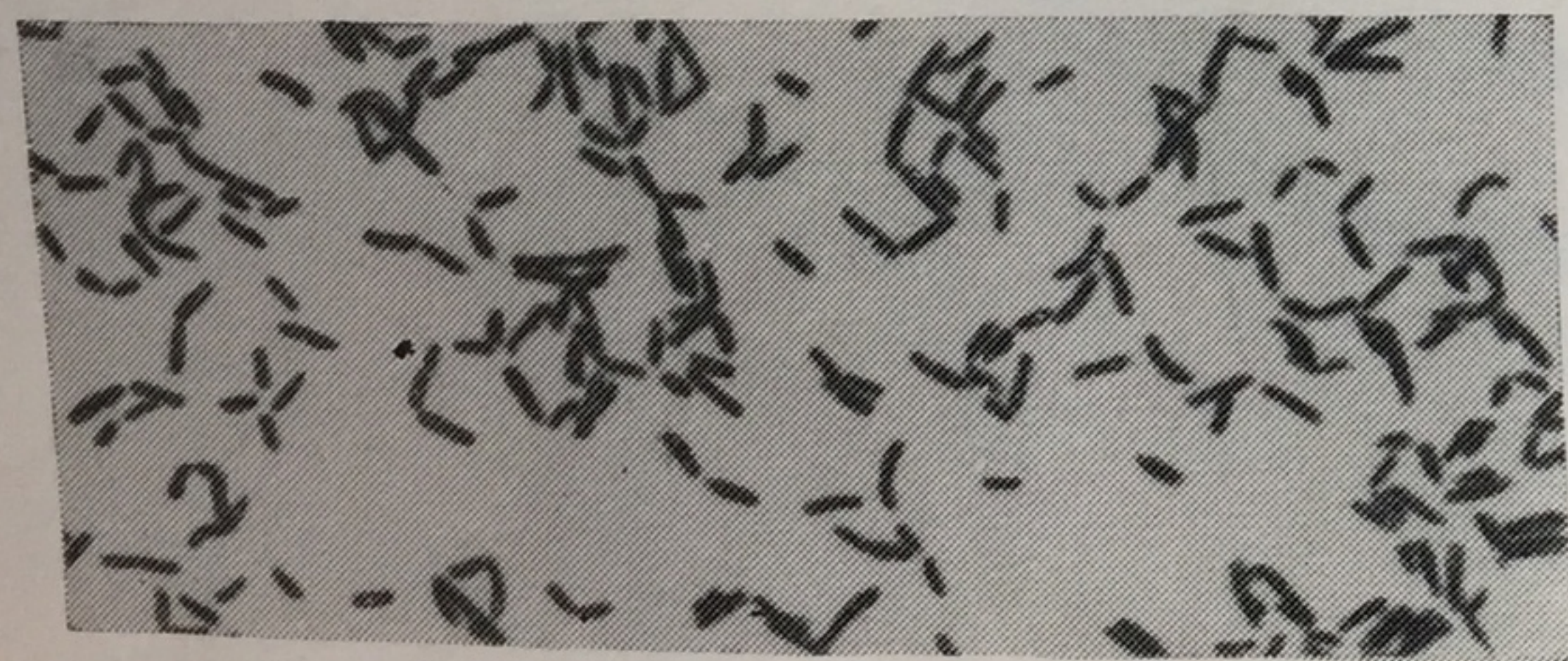




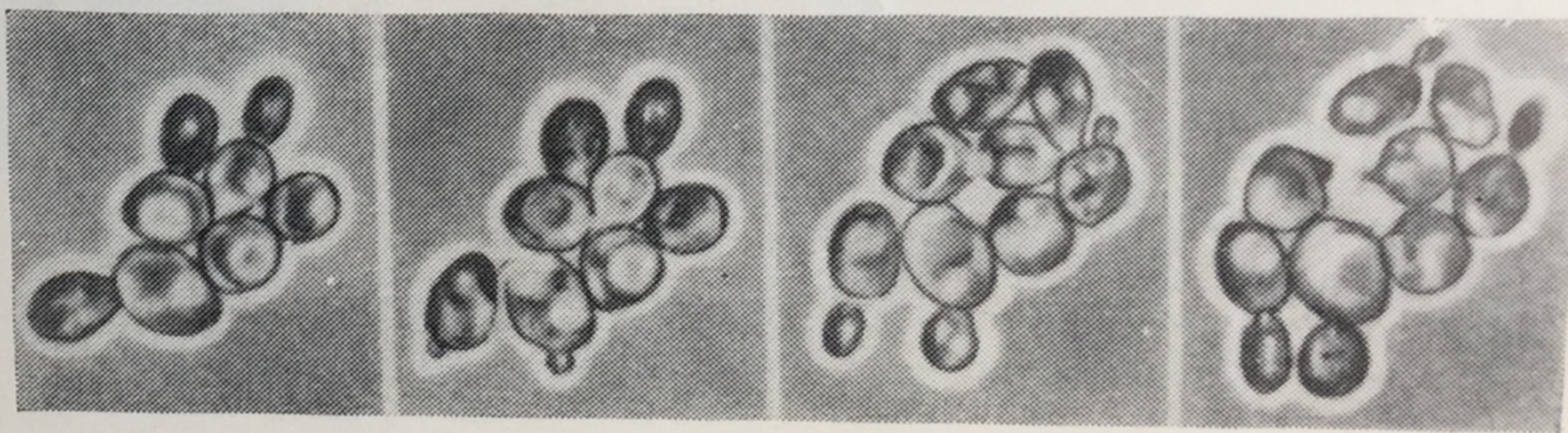
Клетки плесневого гриба *Asp. niger* — продуцента лимонной кислоты



Клетки кормовых дрожжей *Candida utilis*

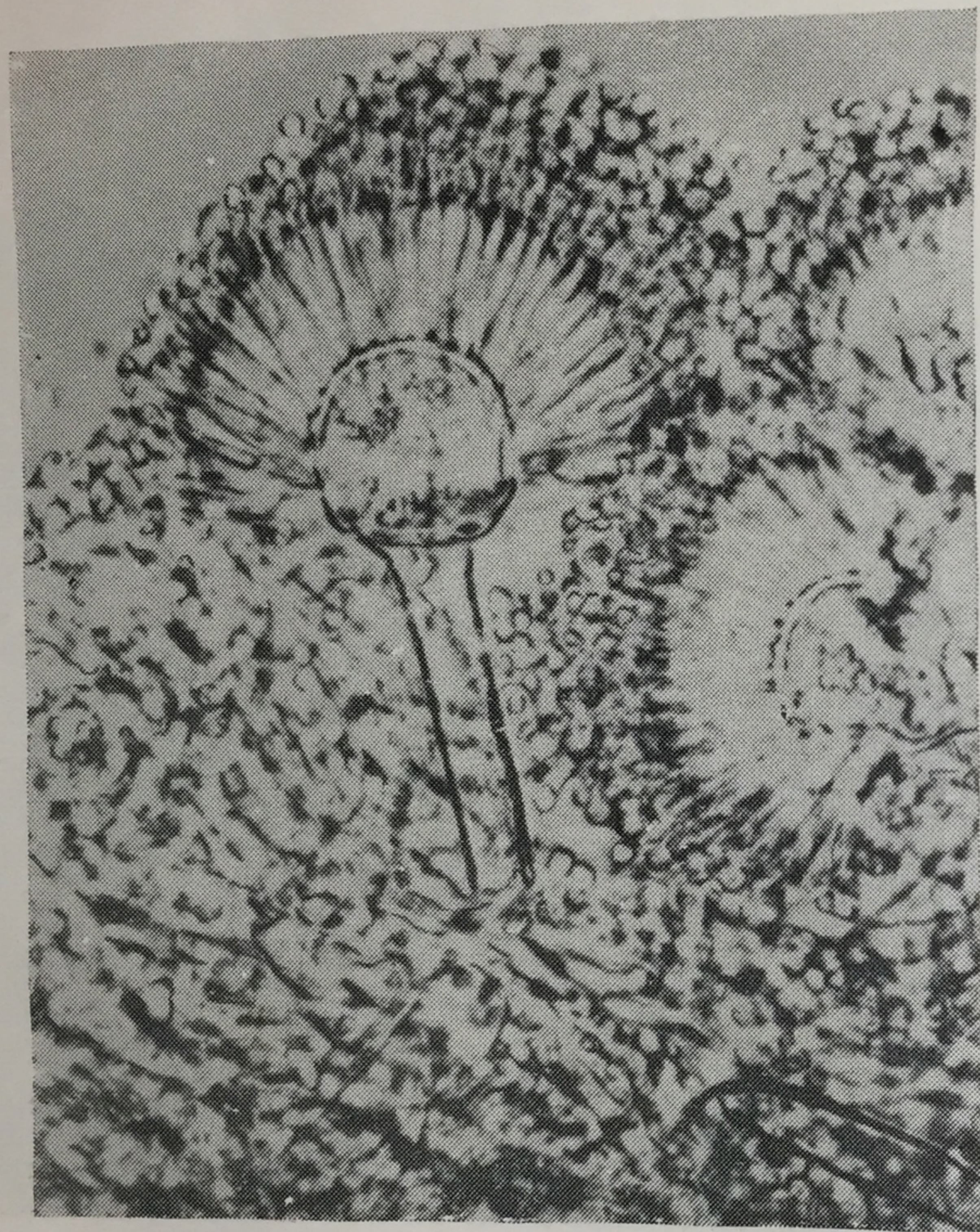


Клетки бактерий *Bac. subtilis* — продуцента амилаз и протеаз

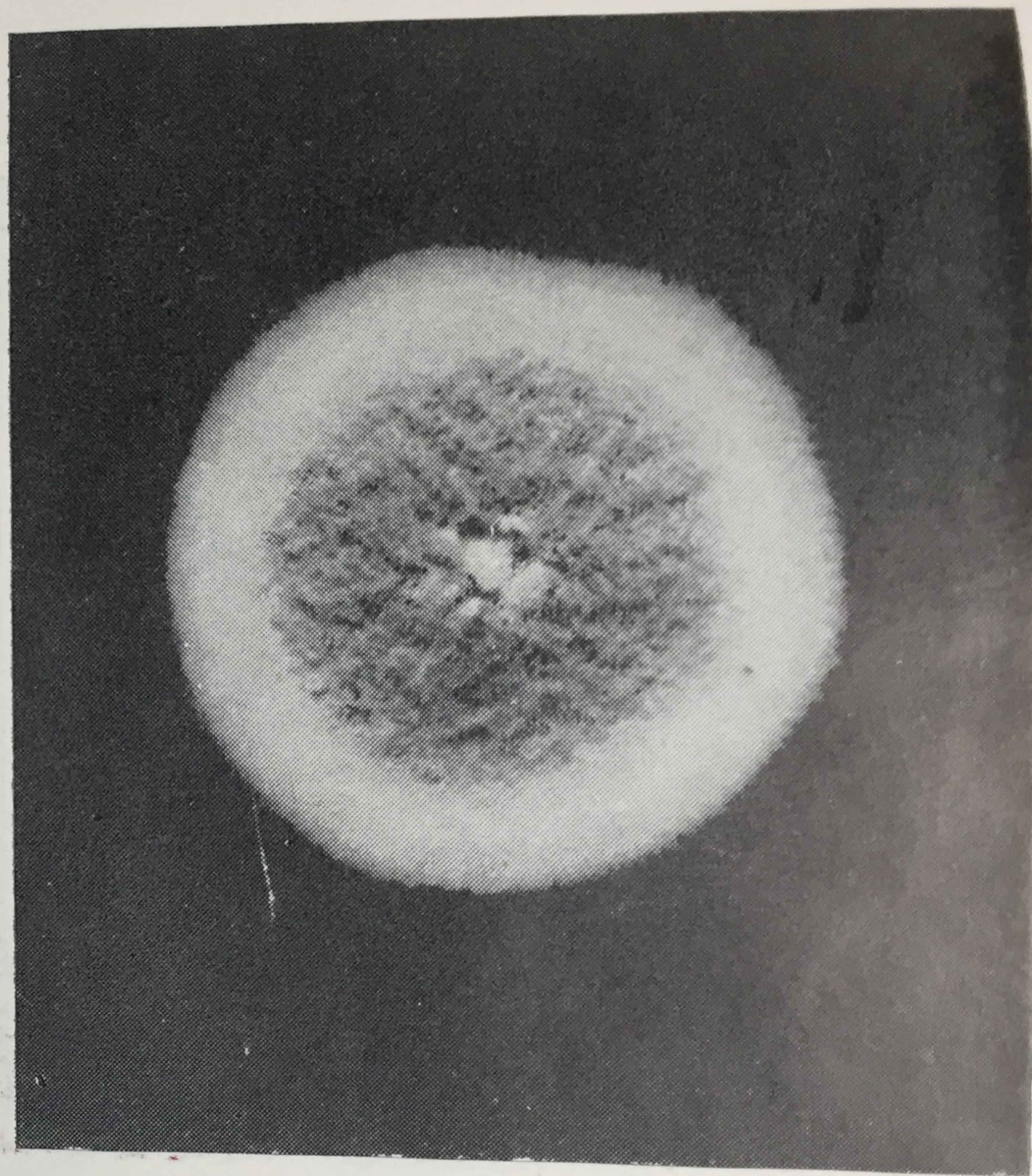


Клетки хлебопекарных дрожжей *Sacch. cerevisiae*





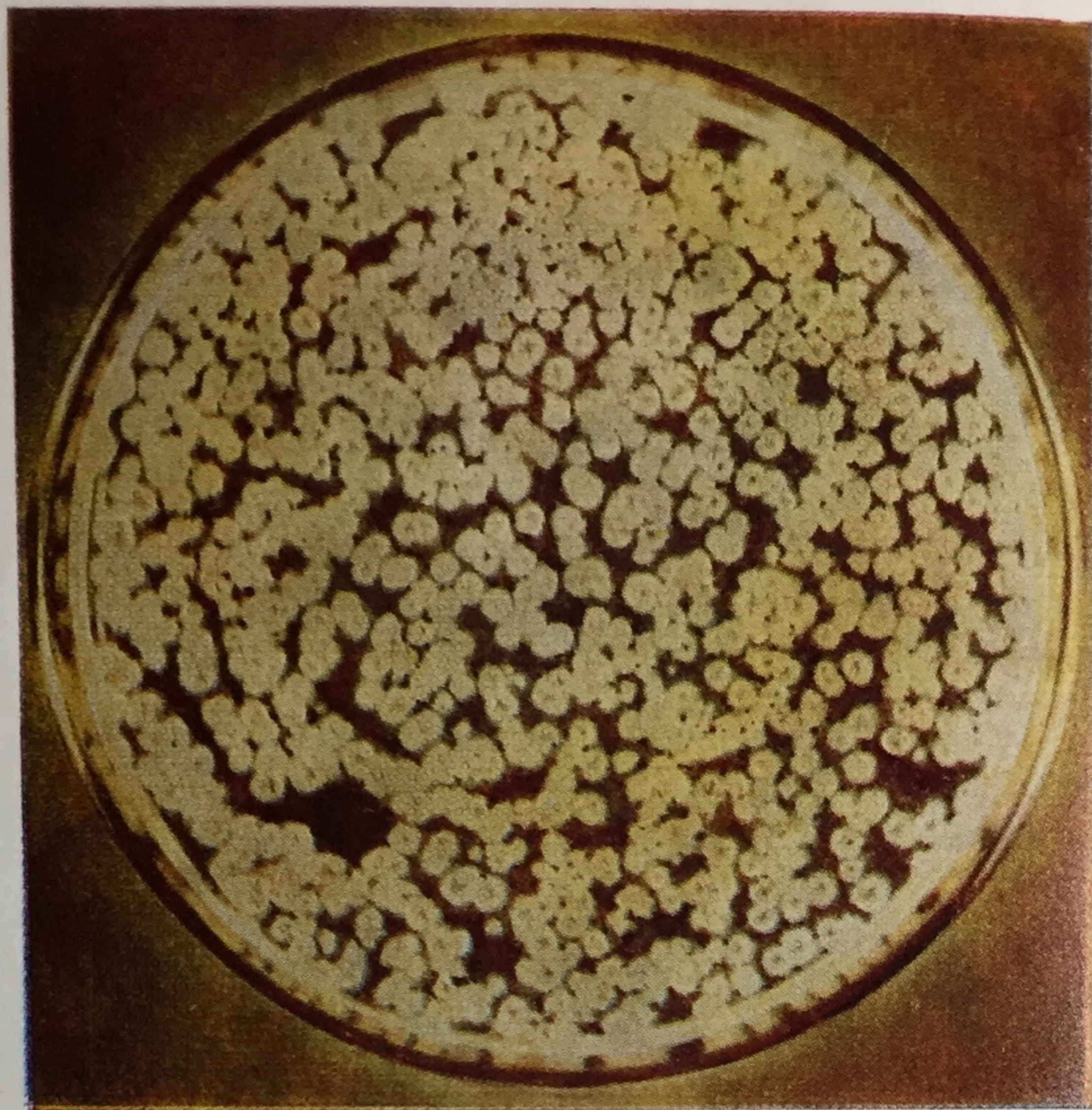
Конидиеносцы с конидиями плесневого гриба *Asp. terreus* — продуцента целлюлазы (фото Р. Зельтень)



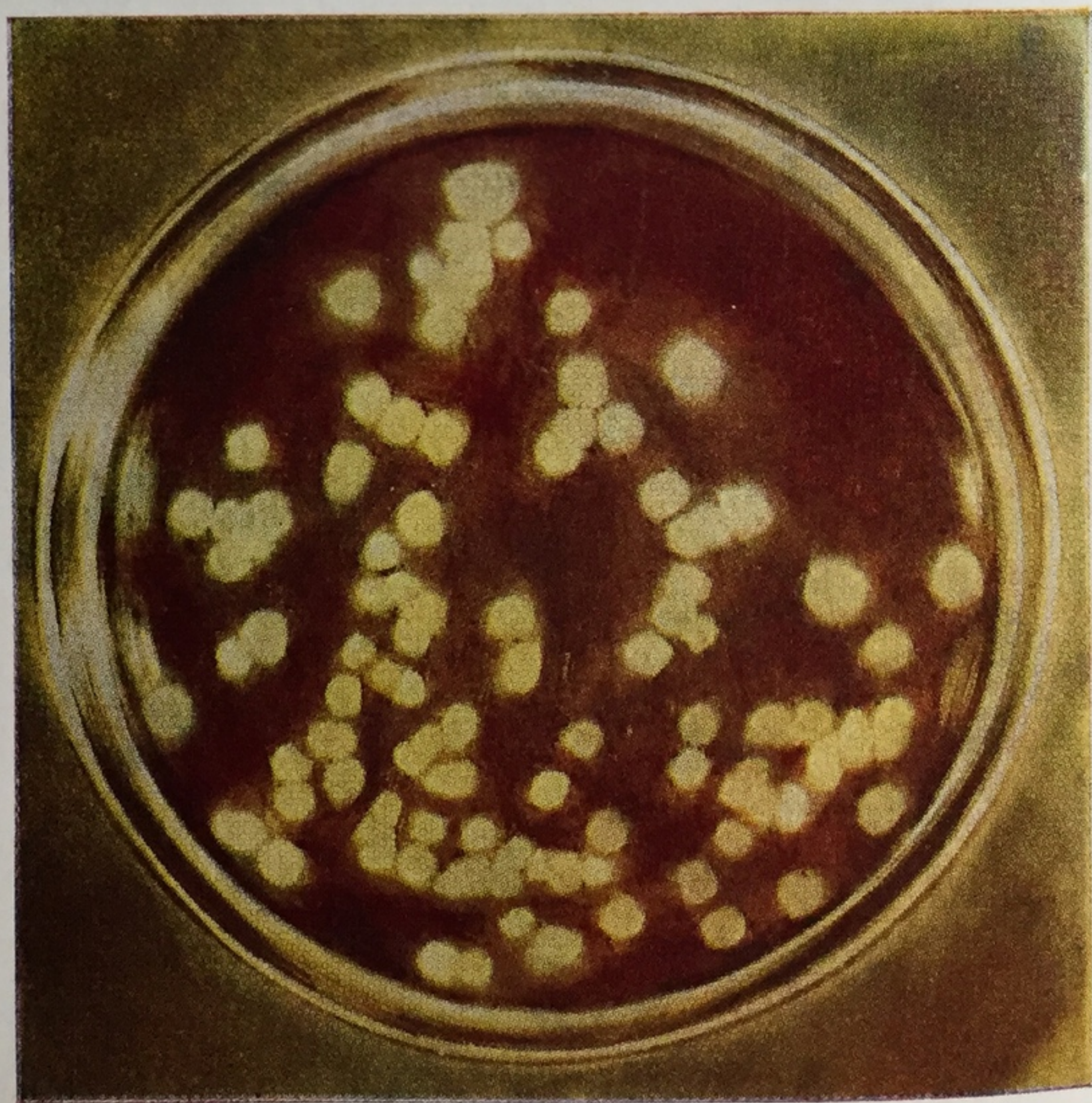
Гигантская колония плесневого гриба *Asp. niger* — продуцента итаконовой кислоты



6

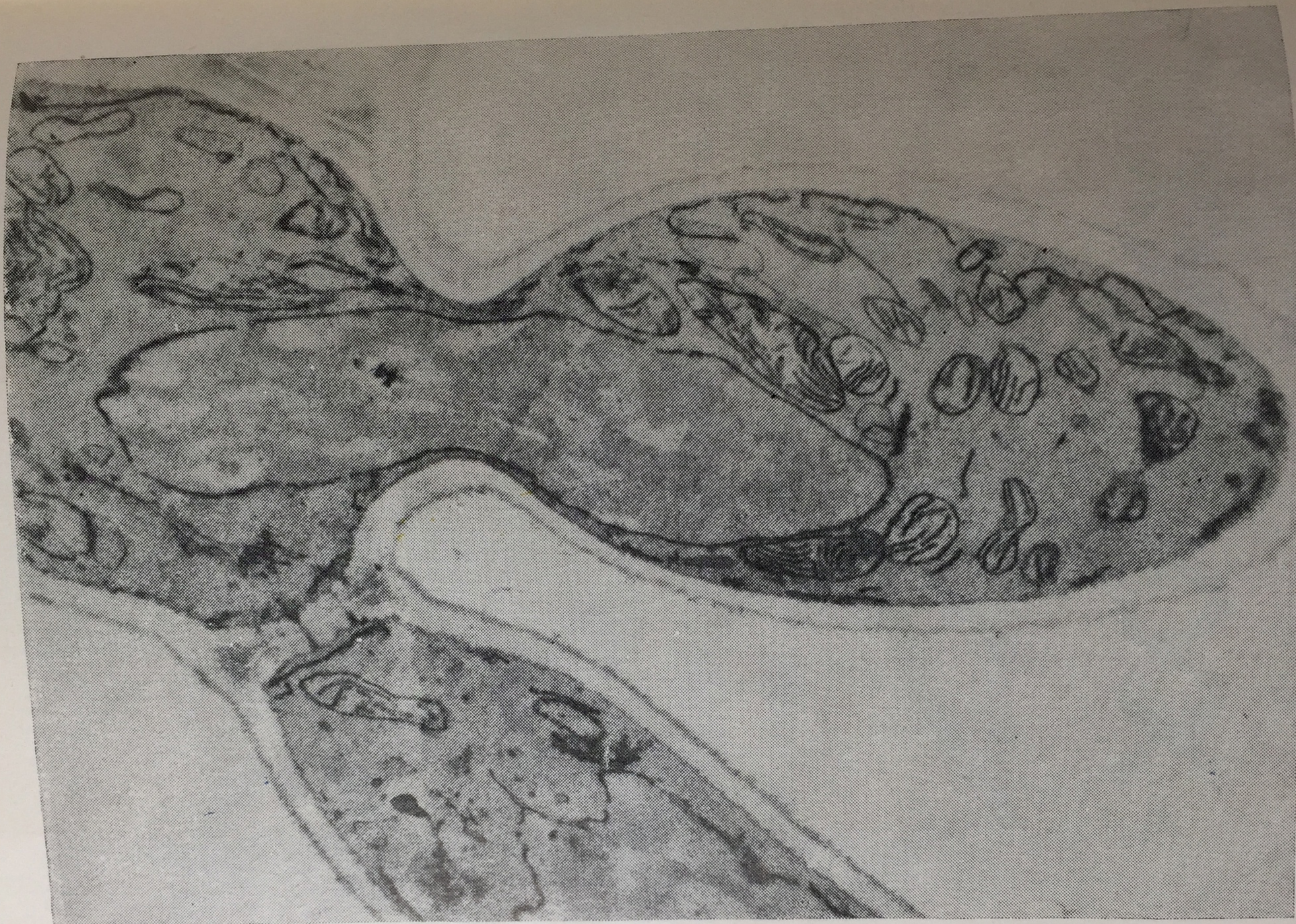


Колонии бактерий *Endomycopsis fibuliger* — продуцента глюкоамилазы



Колонии бактерий *Brevibacterium* sp. 22 (фото Э. Вентыня)





Быстрорастущий мицелий *Endomycopsis fibuliger* на этанольной среде в разрезе при увеличении 18000 $\times$  (фото Э. Вентыня)



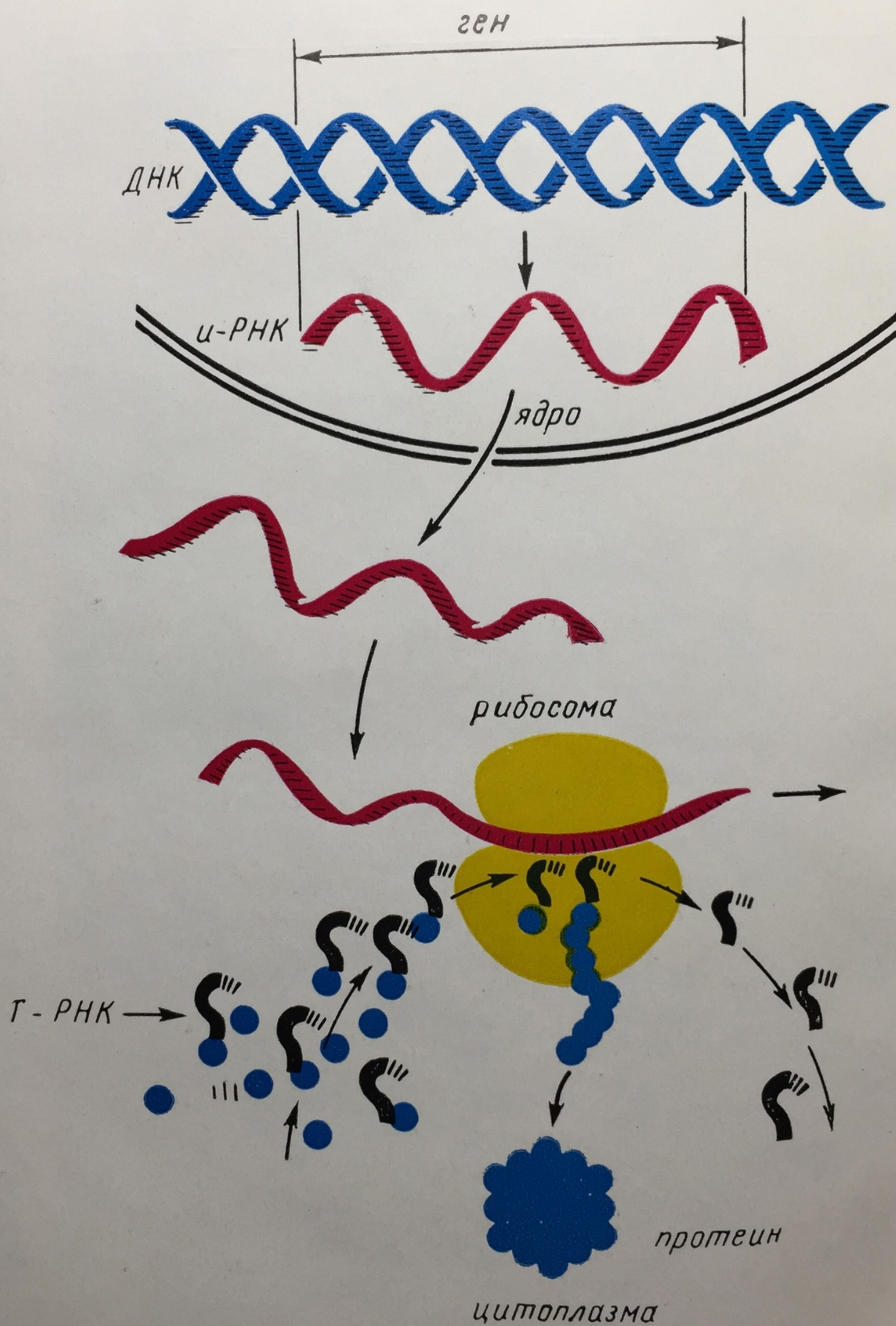


Схема биосинтеза белка (по А. Спирину)



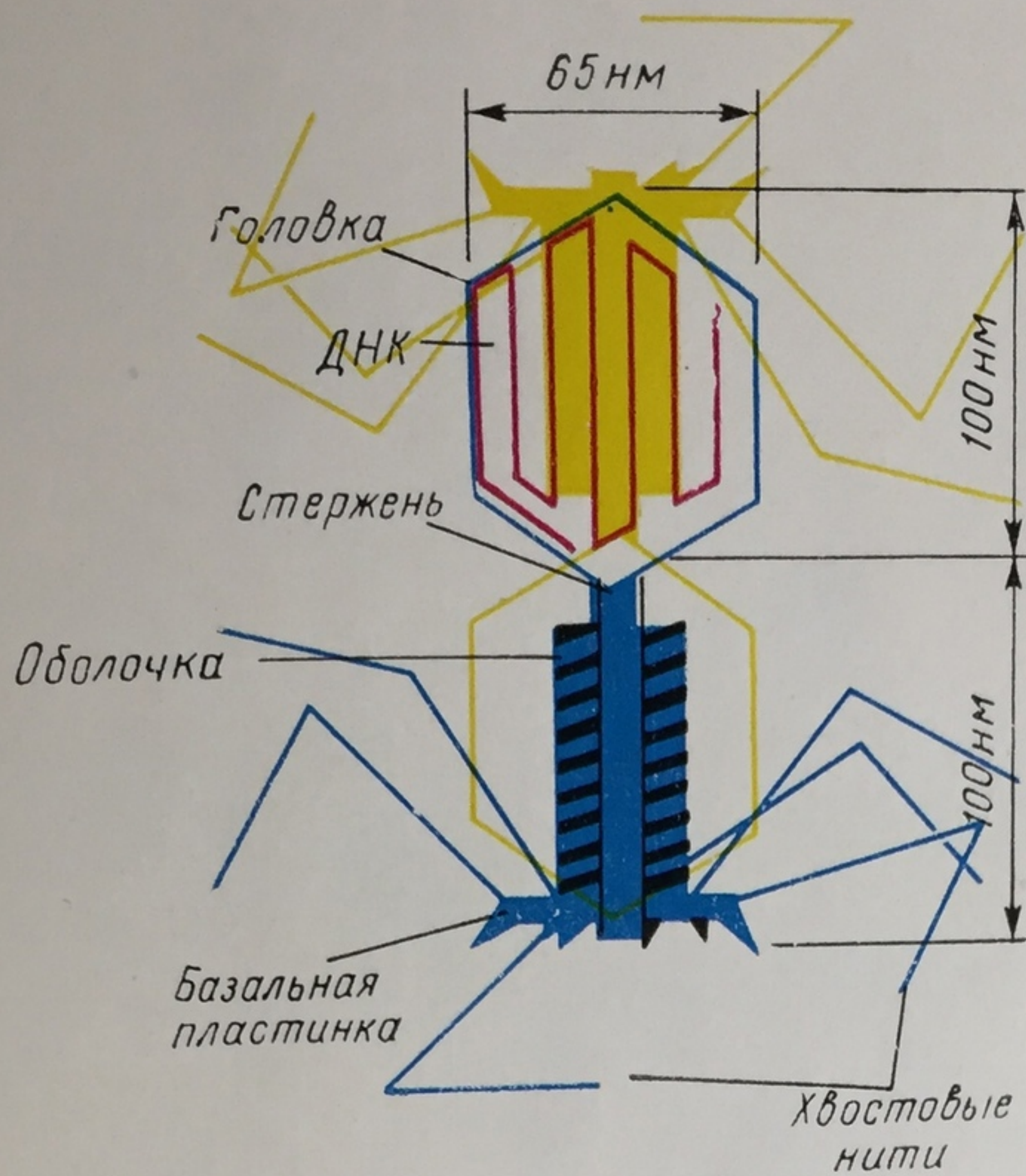
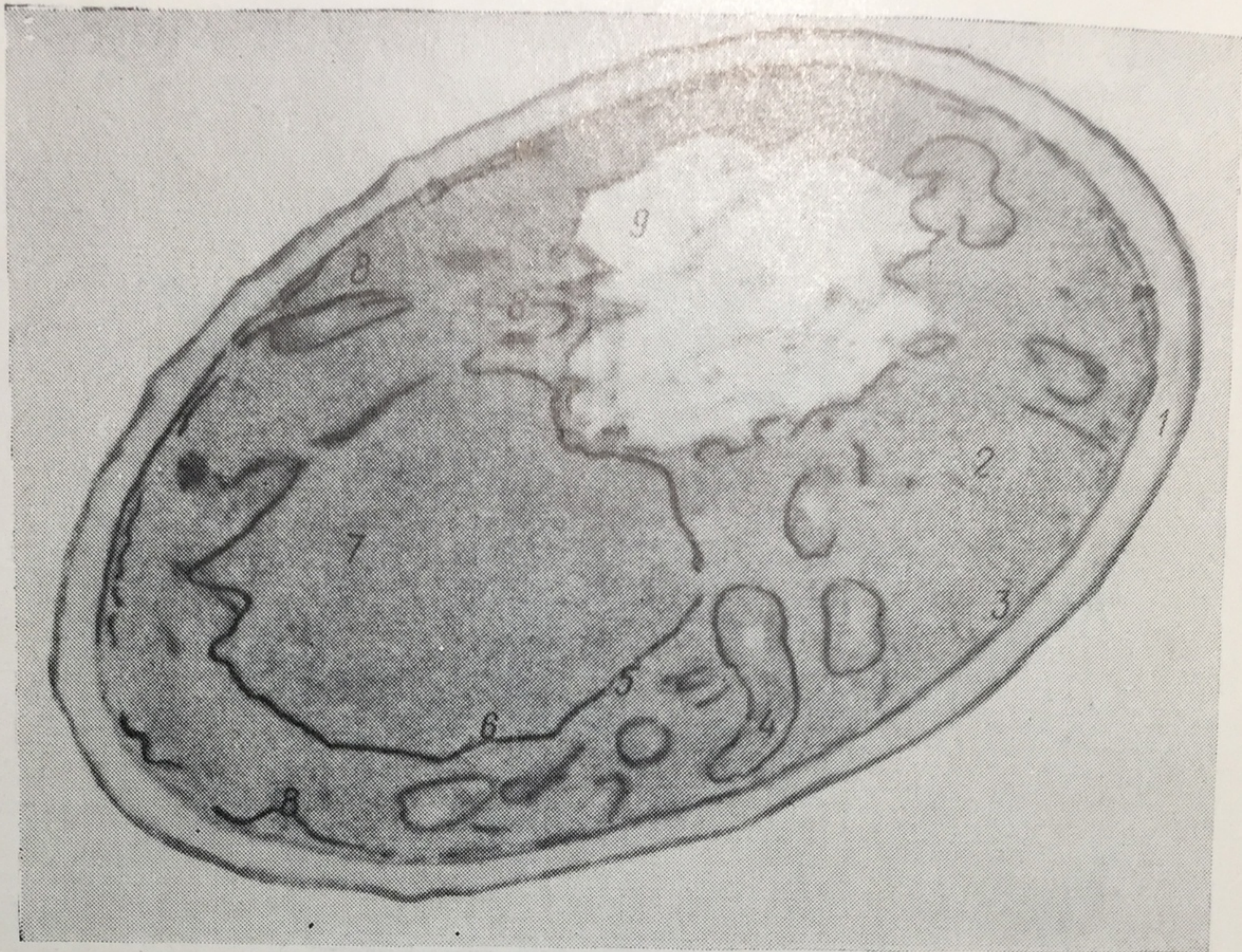


Схема строения бактериофага  $T_2$

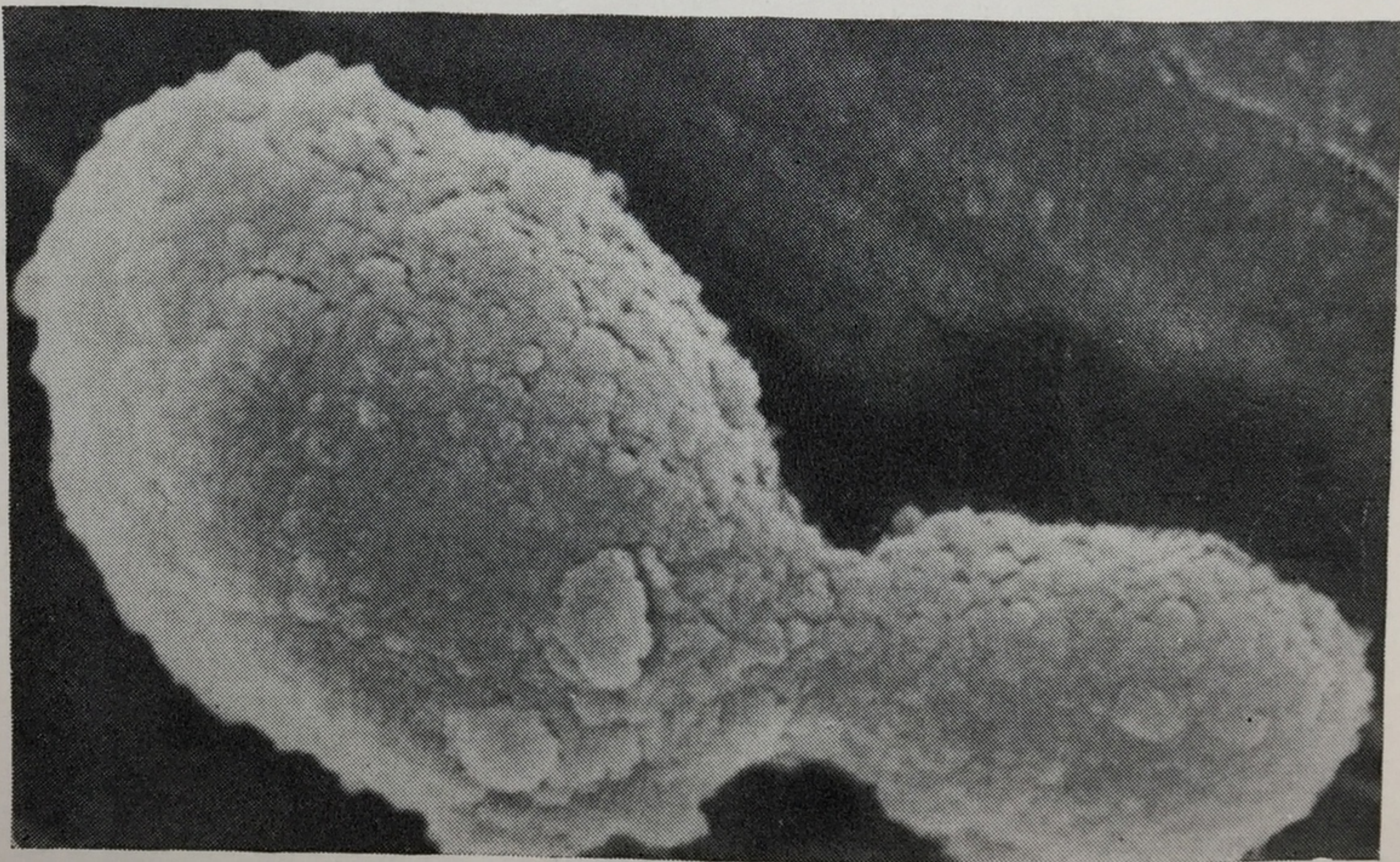


Начальная стадия фаголиза





Разрез клетки хлебопекарных дрожжей *Sacch. cerevisiae* (фото Э. Вентыня):  
 1 — клеточная оболочка, 2 — цитоплазма, 3 — цитоплазматическая мембрана, 4 — митохондрия, 5 — пора ядерной мембраны, 6 — ядерная мембрана, 7 — ядро, 8 — эндоплазматическая сеть, 9 — вакуоль

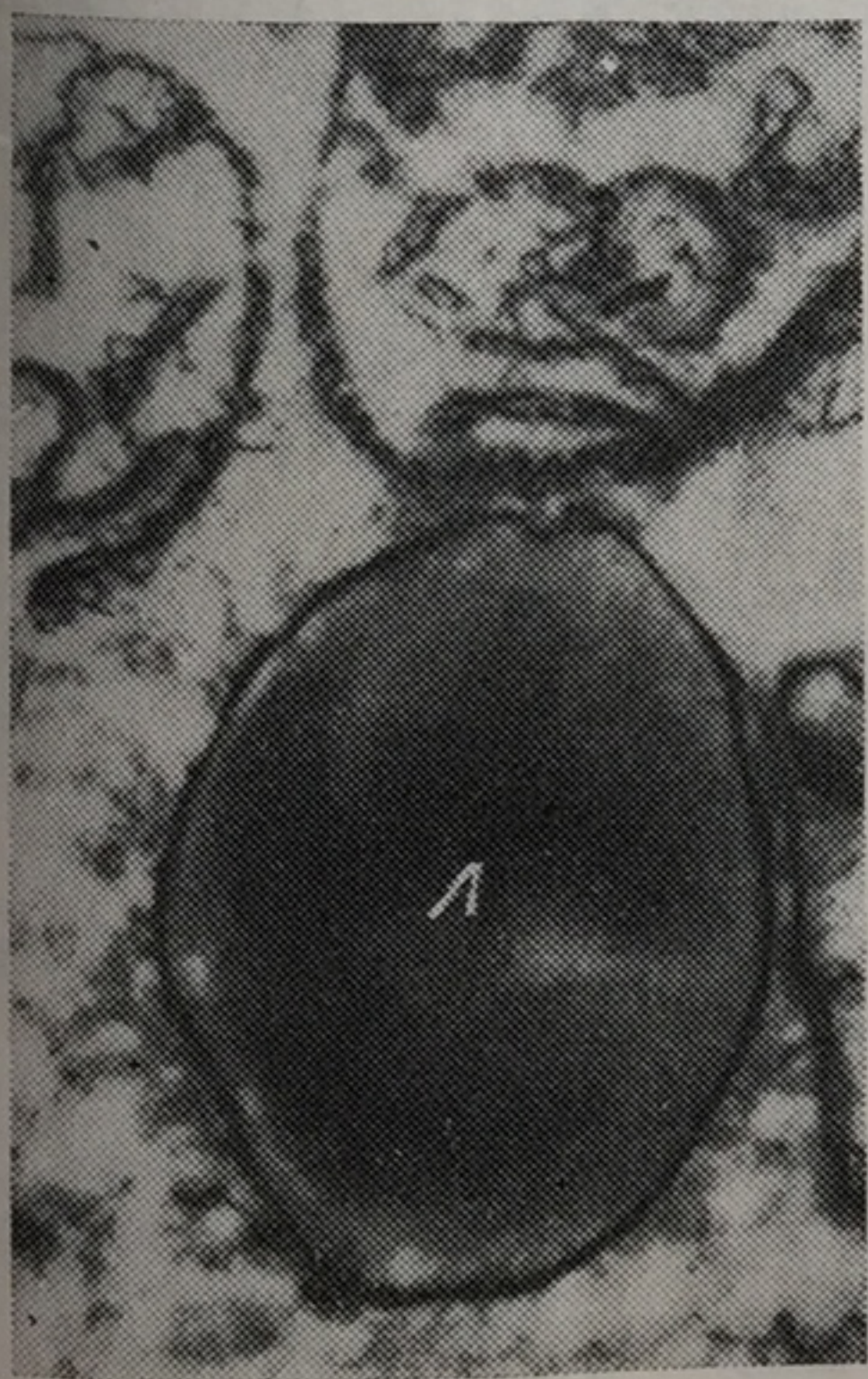


Поверхность клетки хлебопекарных дрожжей *Sacch. cerevisiae* при увеличении 22500X. Снимок получен с помощью электронного микроскопа со сканирующим устройством (фото В. Осе)

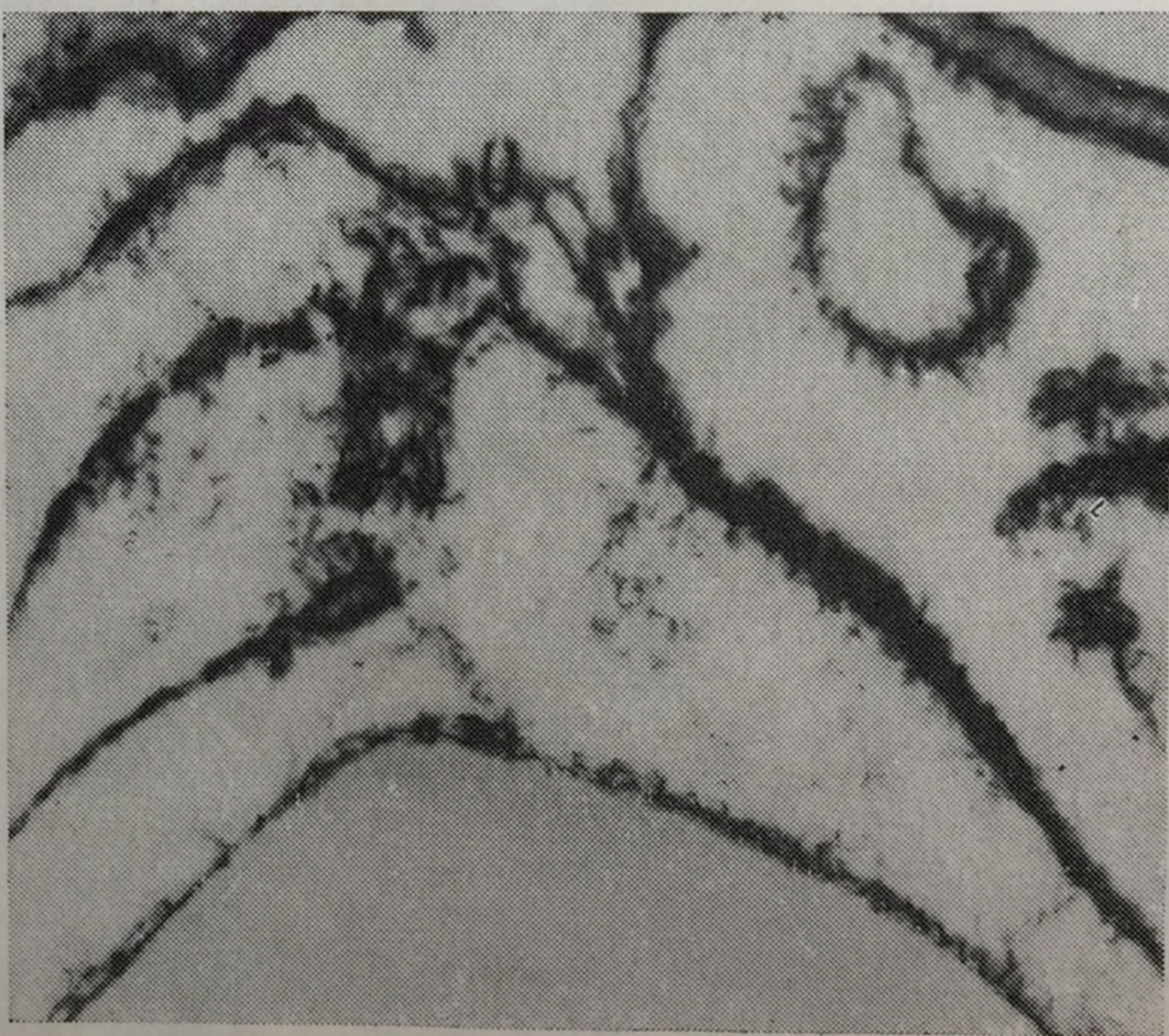




Митохондрии в клетке хлебопекарных дрожжей *Sacch. cerevisiae*, выращенных на спиртовой среде (фото Э. Вентыня)

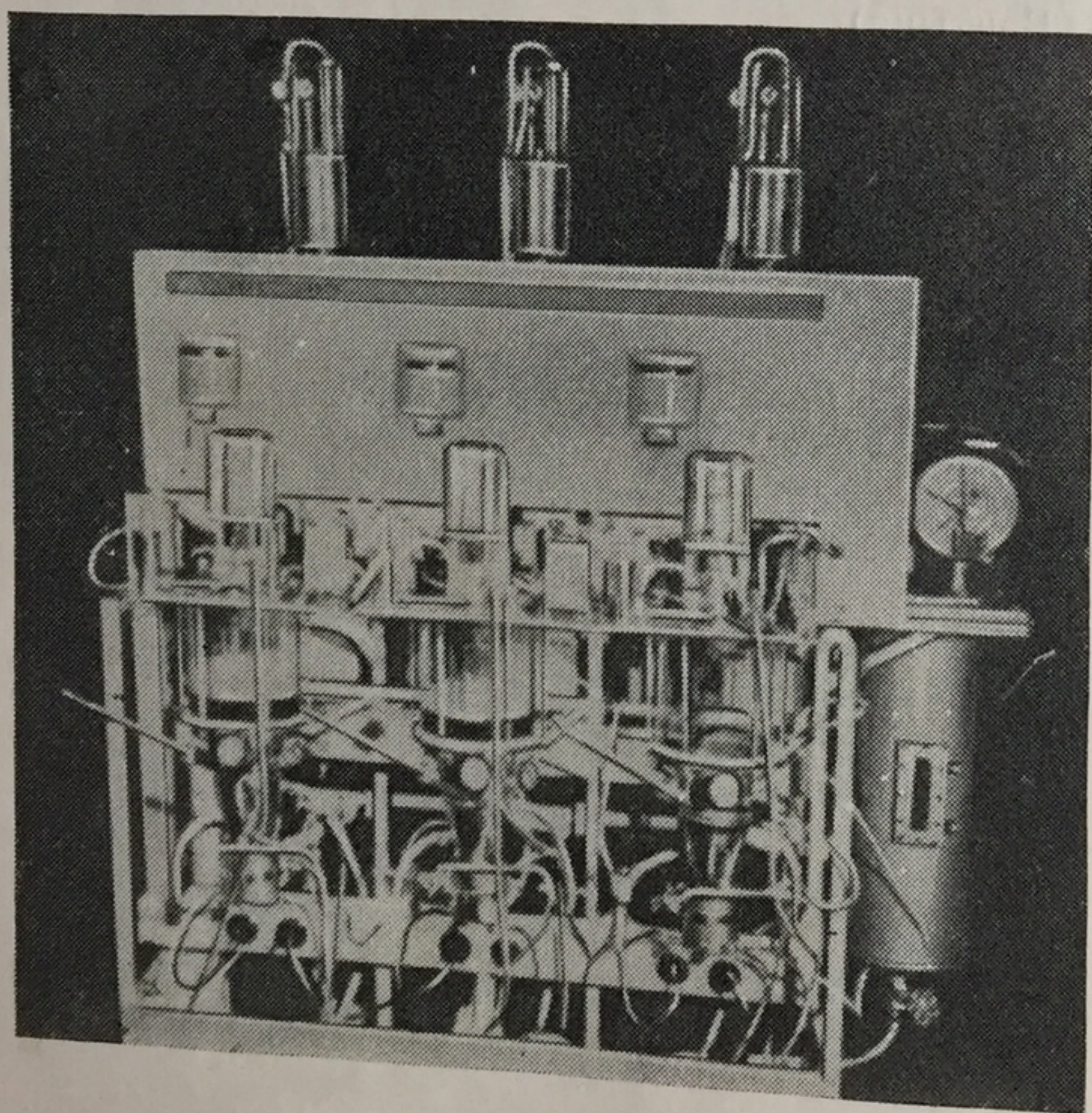
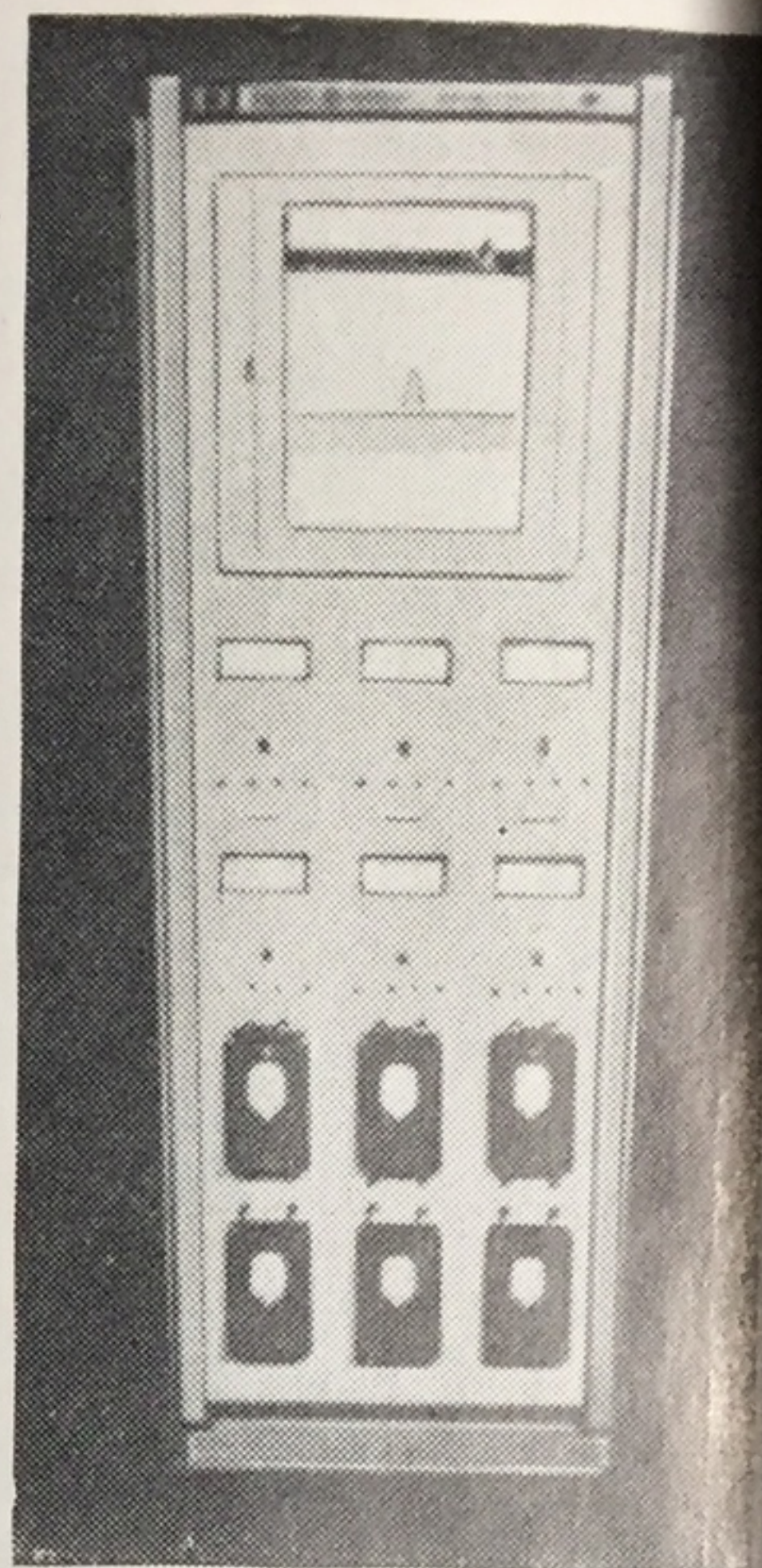
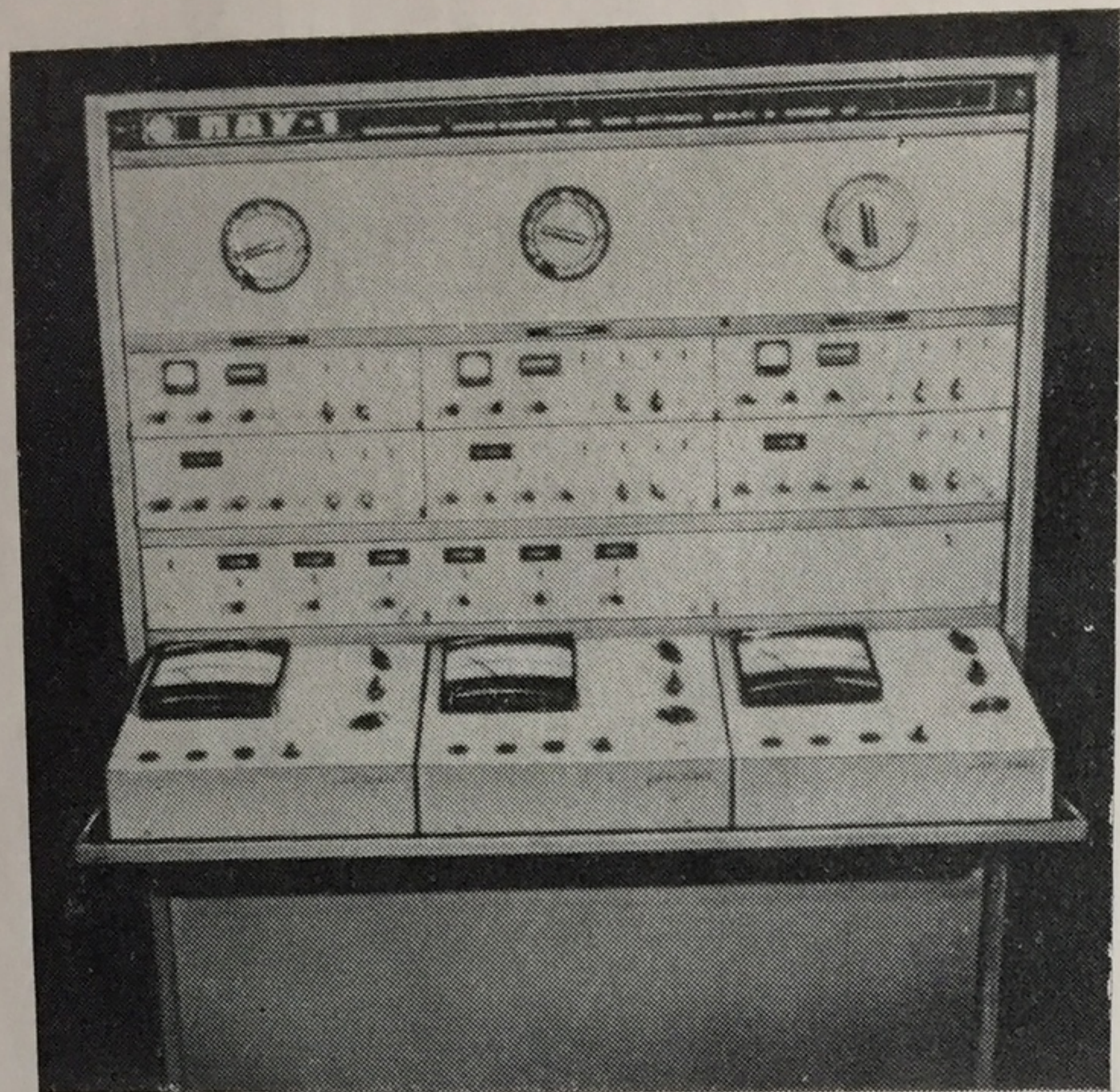


Лизосома (л) среди митохондрий в клетке хлебопекарных дрожжей *Sacch. cerevisiae*



Соединение эндоплазматической сети с цитоплазматической мембраной в клетке хлебопекарных дрожжей *Sacch. cerevisiae*

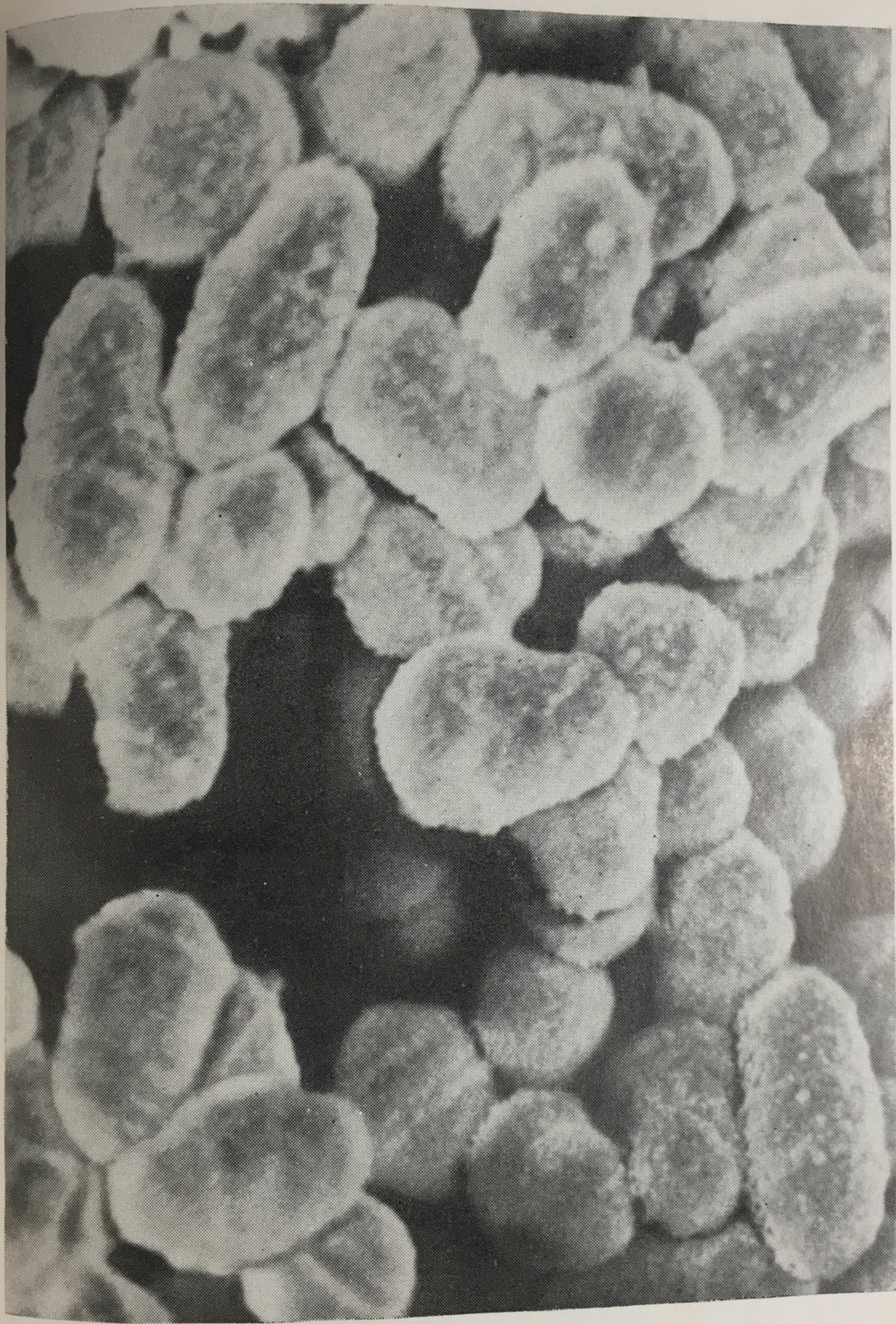




Стенд выращивания  
микроорганизмов

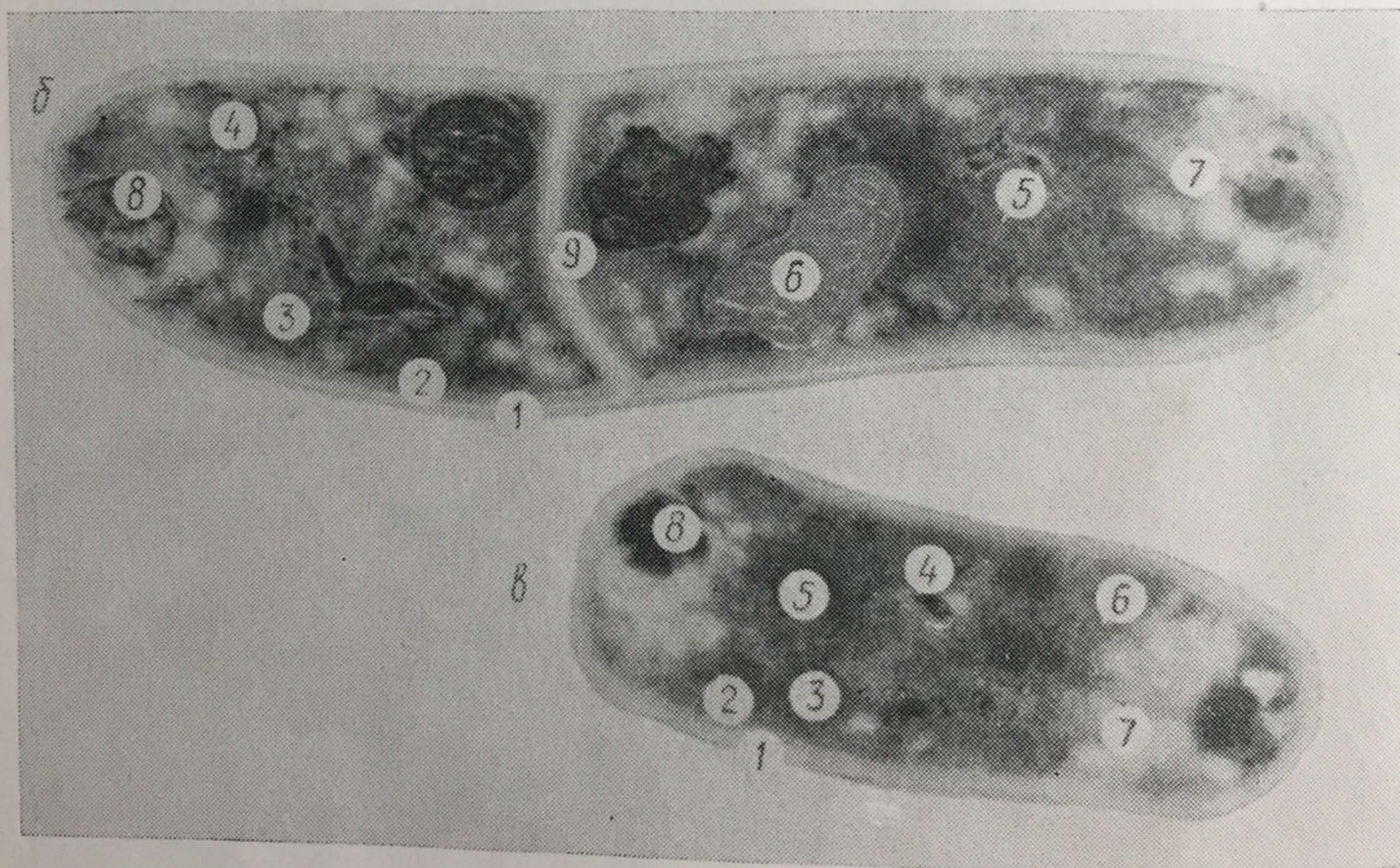
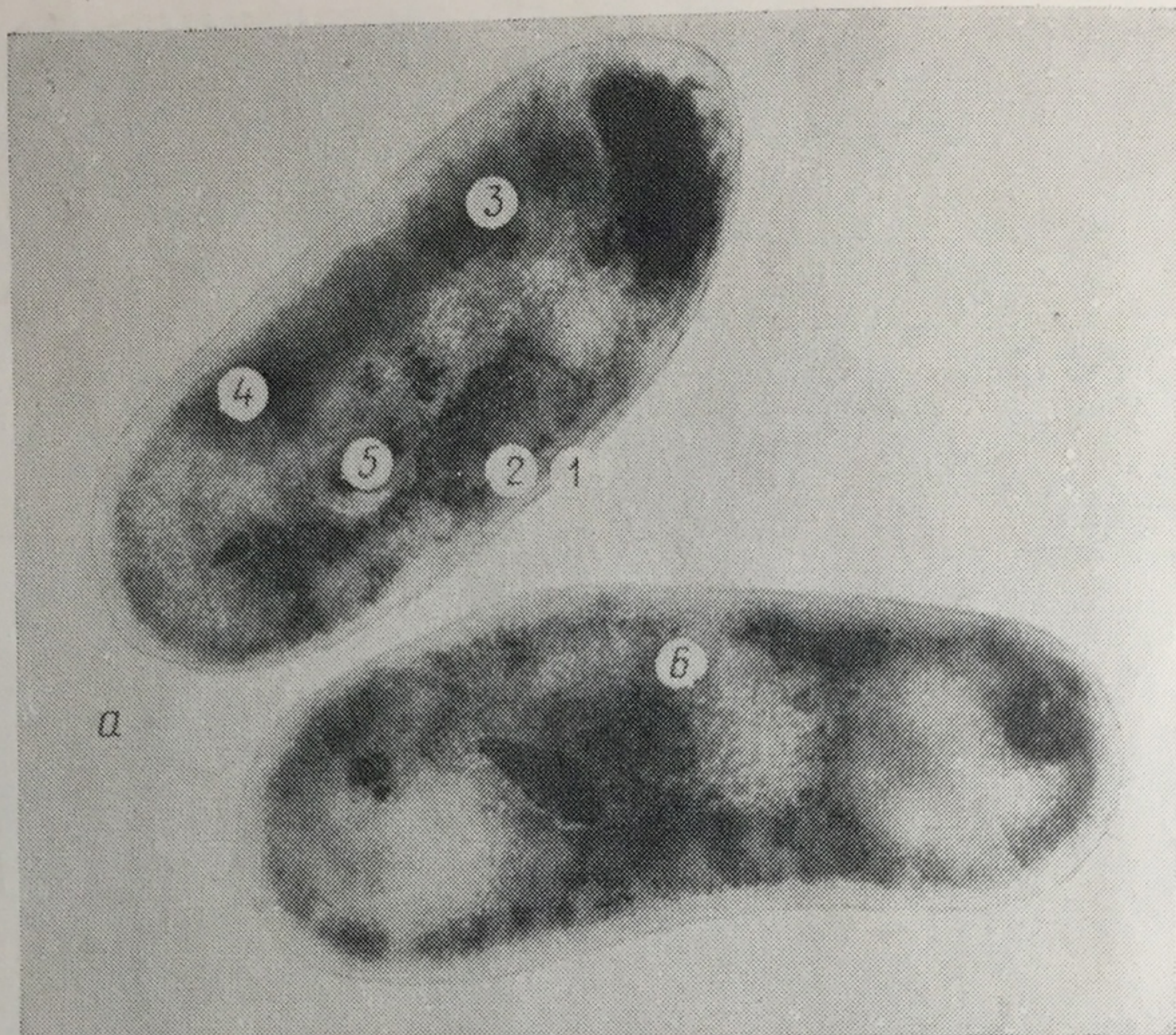
Поверх-  
ной фаз  
микро-





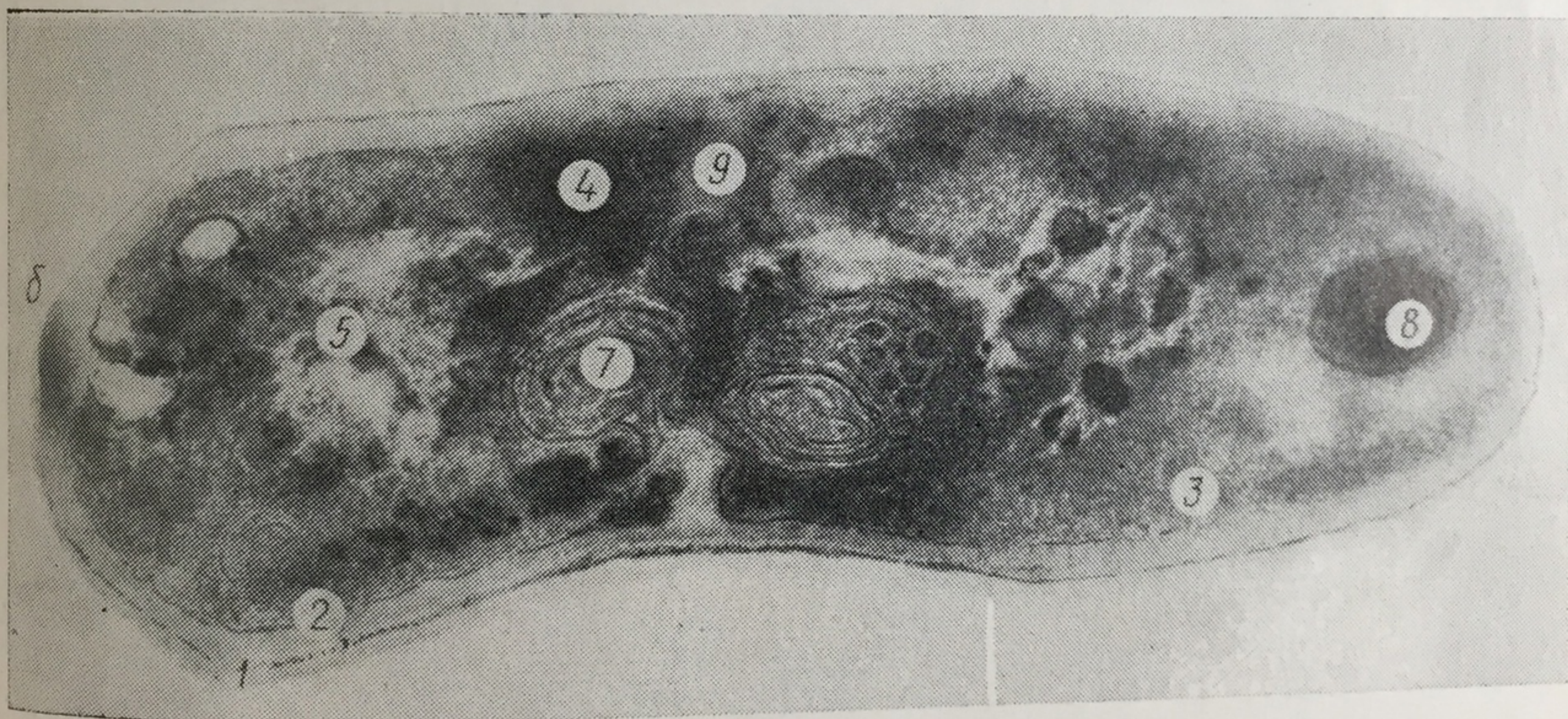
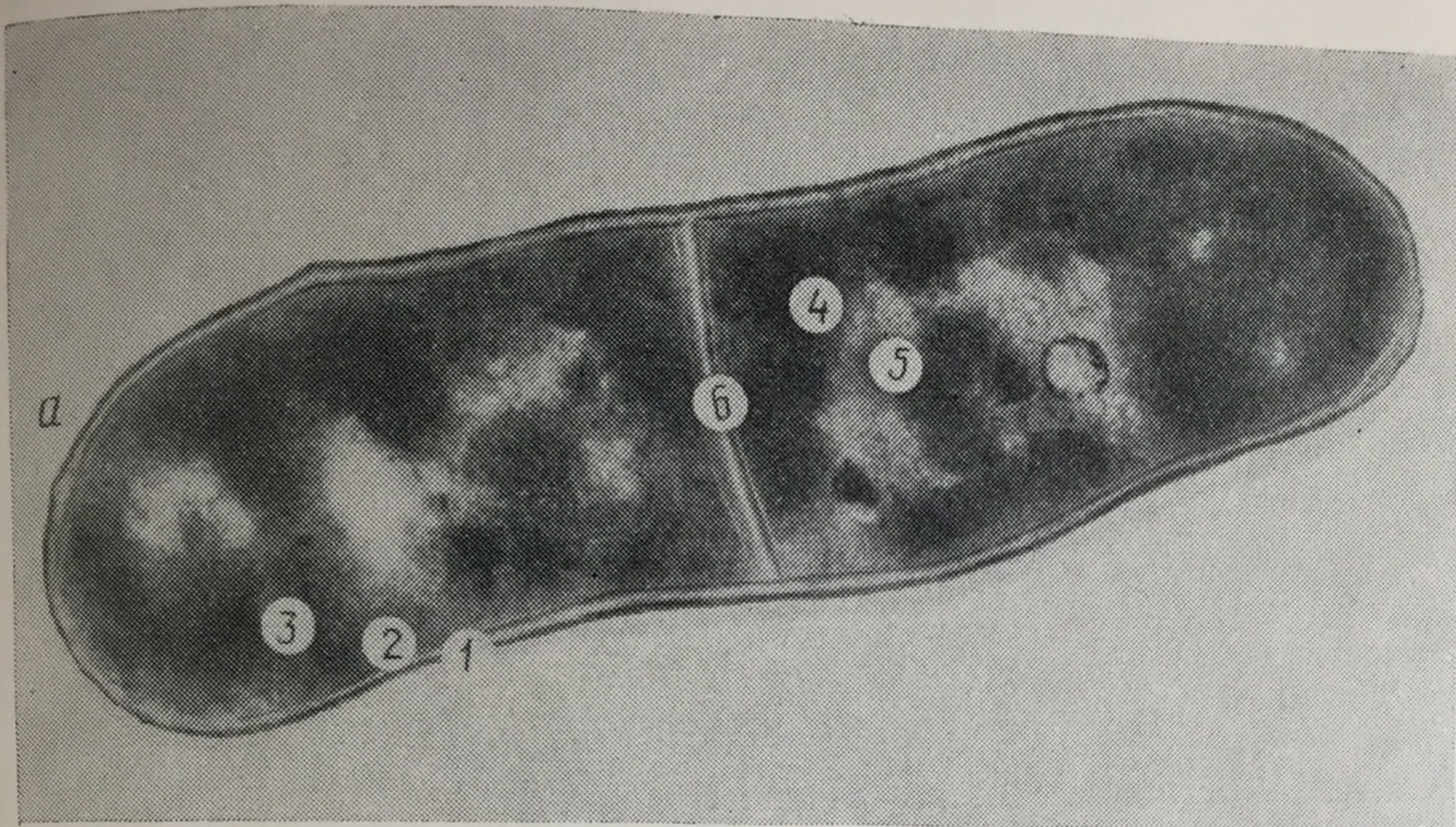
Поверхность клеток хлебопекарных дрожжей *Sacch. cerevisiae* в стационарной фазе при увеличении 40000X. Снимок получен с помощью электронного микроскопа со сканирующим устройством (фото В. Осе)





Клетки *Brevibacterium* sp. 22 — продуцента лизина в условиях периодического культивирования. Снимок получен с помощью электронного микроскопа (фото В. Осе и А. Апсите):  
 а — лаг-фаза, б — логарифмическая фаза, в — стационарная фаза; 1 — клеточная оболочка, 2 — цитоплазматическая мембрана, 3 — цитоплазма, 4 — скопление рибосом, 5 — нуклеотид, 6 — мезосома, 7 — гранулы запасных веществ (гликоген), 8 — гранула полифосфатов, 9 — поперечная стенка

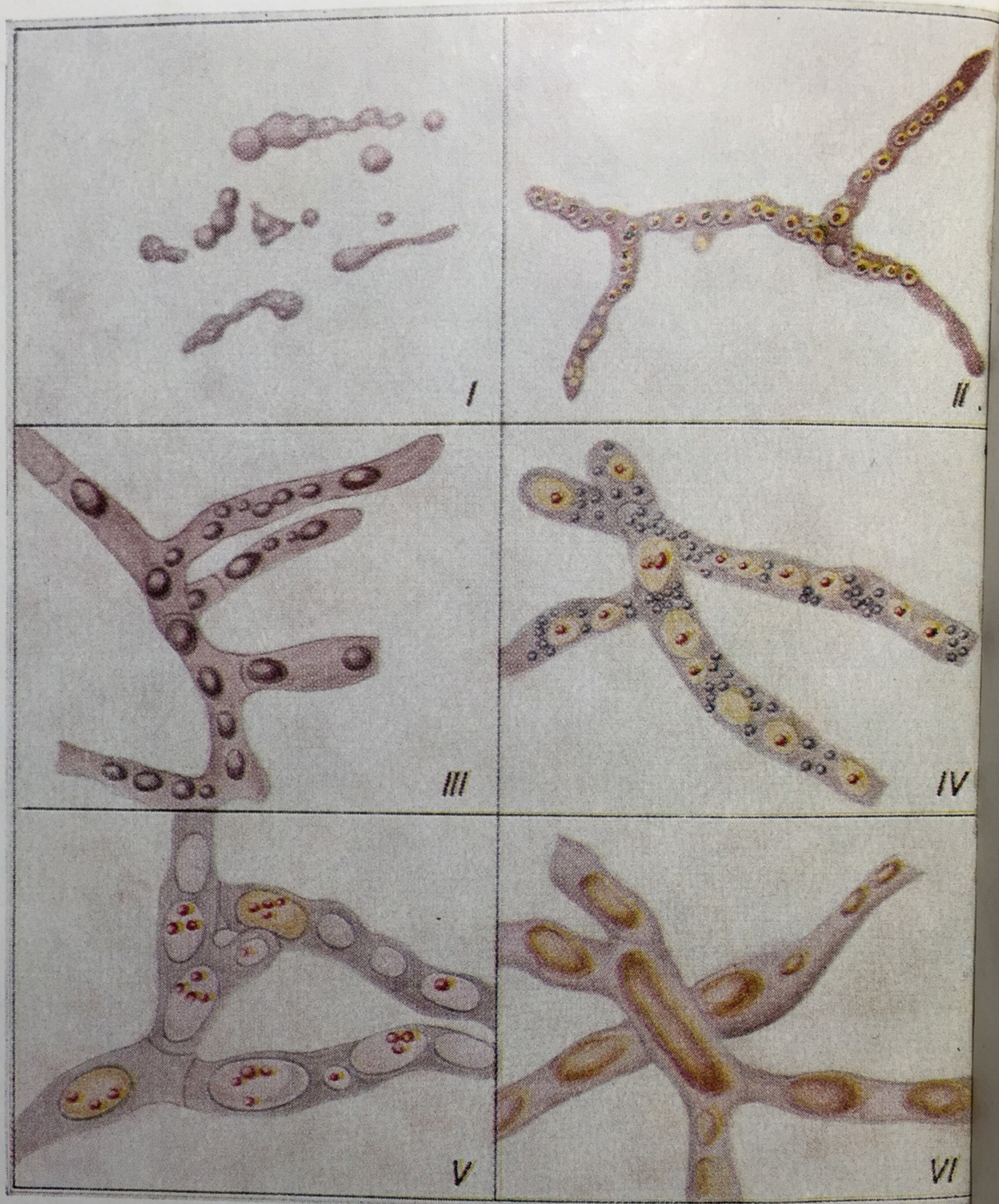




Клетки *Brevibacterium* sp. 22 — продуцента лизина в условиях непрерывного культивирования. Снимок получен с помощью электронного микроскопа (фото В. Осе и А. Апсите):

*a* — клетка с очень большой скоростью роста, *б* — клетка с низкой скоростью роста, интенсивно синтезирующая лизин; 1 — клеточная оболочка, 2 — цитоплазматическая мембрана, 3 — цитоплазма, 4 — скопление рибосом, 5 — нуклеотид, 6 — поперечная стенка, 7 — мезосома, 8 — гранула полифосфатов, 9 — поперечная стенка





Фазы развития плесневого гриба *Penicillium chrisogenum* — продуцента пенициллина

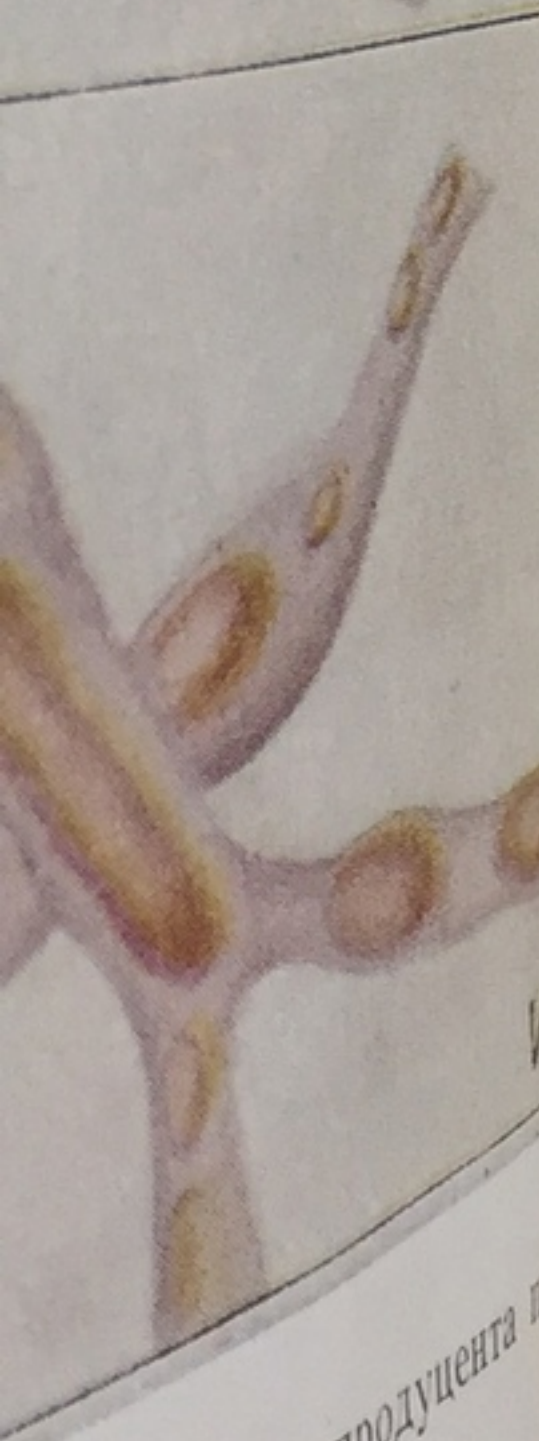




II



IV



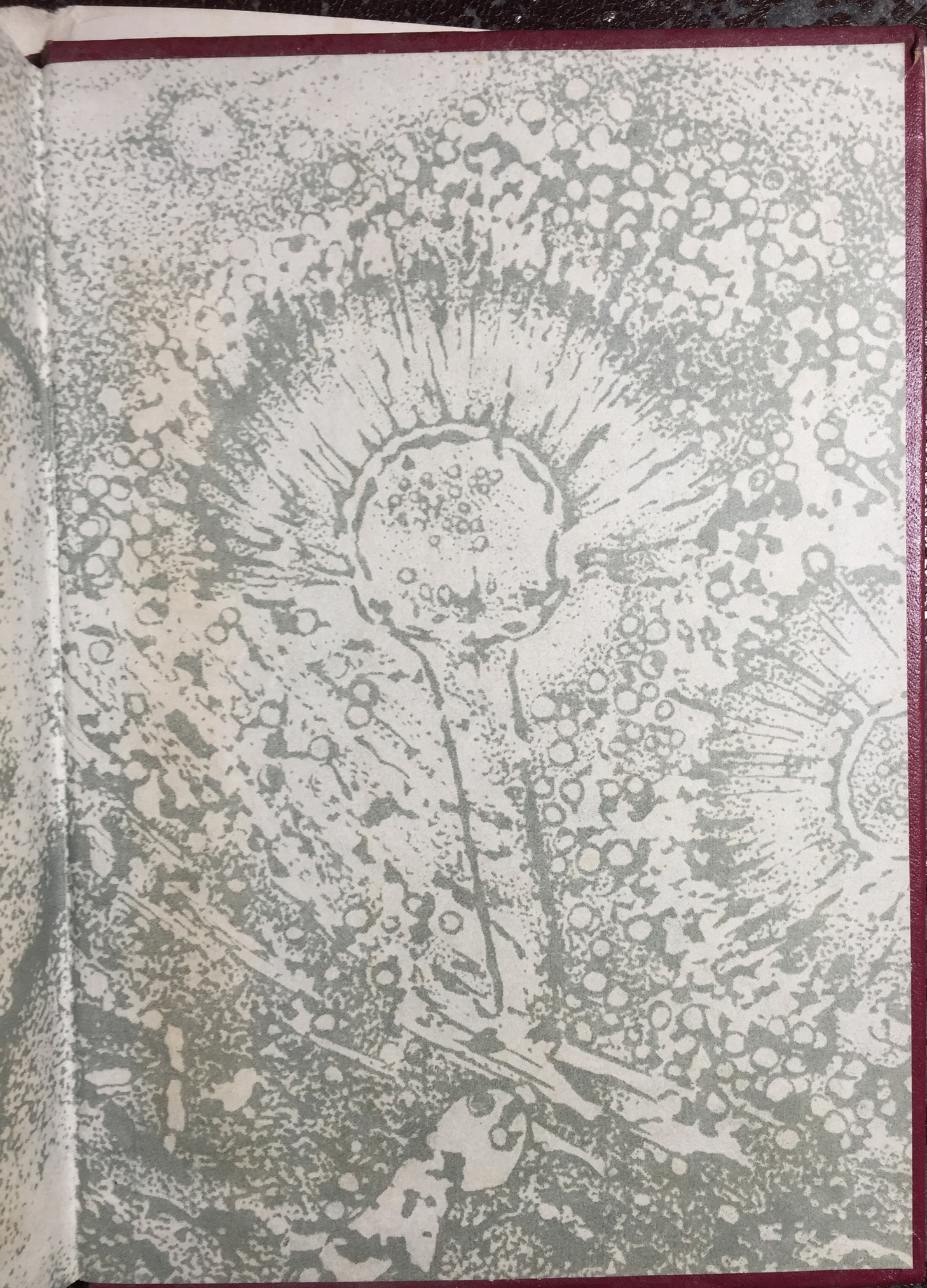
VI

risogenum — продуцента











1 р. 20 к.





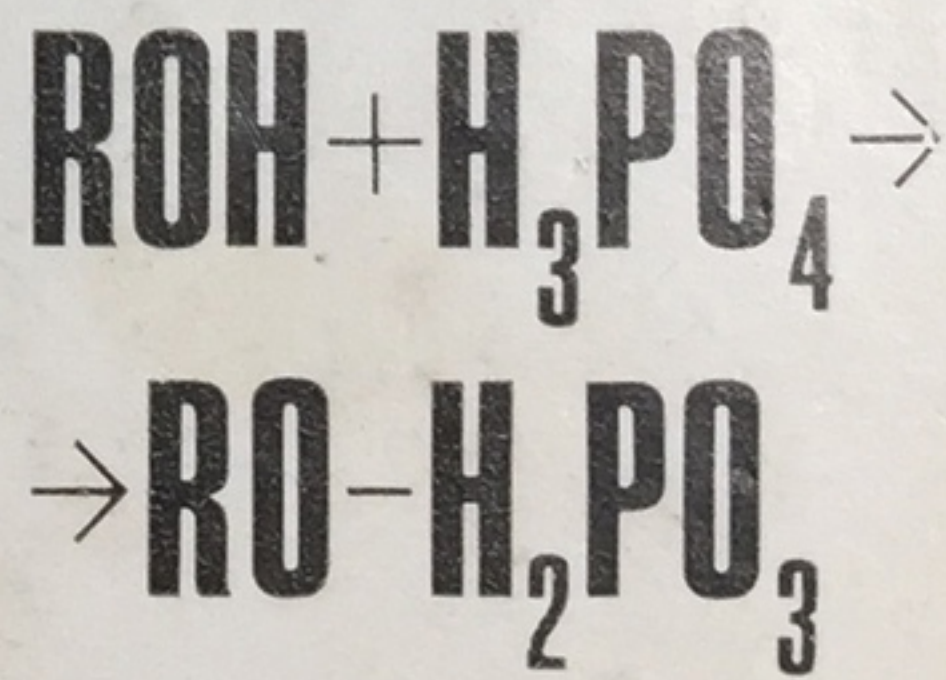
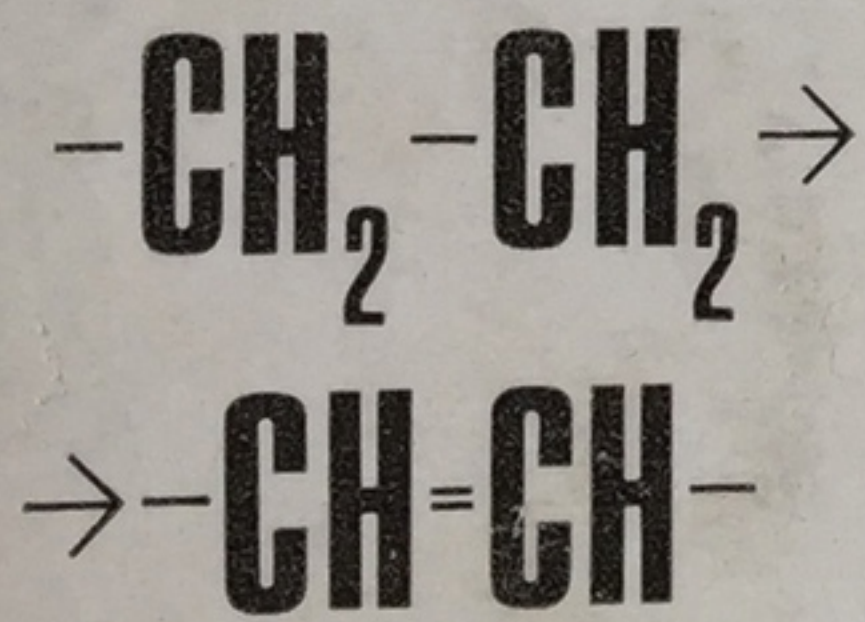
1 p. 20 r.





JEFFERS • BIRD • EXHIBITION • OFFICIAL







М. Е. БИЖЕР  
ВВЕЩИ БИОТНОЮ